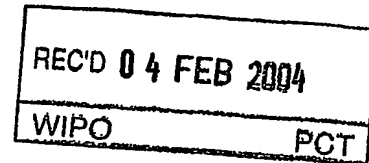


5475

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP 03 / 1 4 6 4 9

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 61 188.2

Anmeldetag: 20. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: Metanomics GmbH & Co KGaA, Berlin/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren

IPC: C 12 N 15/63

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren folgende Schritte umfasst:
- 5 a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Threonin-abbauendes Protein codiert, oder
- b) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz, die den Threoninabbau in den transgenen Organismen erhöht und
- 10 c) Expression einer unter (a) oder (b) genannten Nukleinsäuresequenz im transgenen Organismus.
2. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass im Verfahrensschritt (a) gemäß Anspruch 1 eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuresequenzen:
- 15 i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz;
- ii) einer Nukleinsäuresequenz, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz erhalten wird und
- 20 iii) eines Derivats der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz codiert und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
3. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass im Verfahrensschritt (a) gemäß Anspruch 1 eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuresequenzen:
- 25 i) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 dargestellten Aminosäuresequenz erhalten wird;
- 30 ii) eines Derivats der Nukleinsäuresequenz, die durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 dargestellten Aminosäuresequenz erhalten wird und welche mindestens 70 % Homologie auf Aminosäureebene zu den vorgenannten Aminosäuresequenzen aufweist, ohne dass die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
- 35

4. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus nach Einbringen und Expression der Nukleinsäure kultiviert und geerntet wird.
- 5 5. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäure aus dem Organismus oder dem Kulturmedium oder dem Organismus und dem Kulturmedium isoliert wird.
6. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäure ausgewählt ist aus der Gruppe Methionin, Homoserin und Lysin.
- 10 7. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die essentielle Aminosäure Methionin handelt.
- 15 8. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem transgenen Organismus um einen Mikroorganismus oder um eine Pflanze handelt.
- 20 9. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem transgenen Organismus um einen Mikroorganismus ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen Corynebacterium, Brevibacterium, Escherichia, Bacillus, Rhodotorula, Hansenula, Schizosaccharomyces, Saccharomyces, Candida, Claviceps oder Flavobacterium handelt.
- 25 10. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem transgenen Organismus um eine Pflanze ausgewählt aus der Gruppe der Nutzpflanzen handelt.
- 30 11. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem transgenen Organismus um eine Pflanze ausgewählt aus der Gruppe der Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Olive, Sesam, Haselnuss, Mandel, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Salat, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Hirse, Triticale, Reis, Gerste, Maniok, Kartoffel, Zuckerrübe, Futterrübe, Aubergine, Tomate, Erbse, Alfaalfa sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte handelt.
- 35 12. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz aus einem Eukaryont stammt.
13. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz aus der Gattung Saccharomyces stammt.

3

14. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz zum Einbringen und zur Expression in ein Nukleinsäurekonstrukt oder einen Vektor eingebaut wird.
- 5 15. Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen nach den Ansprüchen 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich Biosynthesegene der im Verfahren hergestellten Aminosäure in den Organismus eingebracht werden.
16. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3, die funktionell mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
- 10 17. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 16.
18. Transgener prokaryontischer oder eukaryontischer Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 16 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 17.
- 15 19. Transgener prokaryontischer oder eukaryontischer Organismus nach Anspruch 18, wobei es sich um einen Mikroorganismus oder um eine Pflanze handelt.
20. Transgener prokaryontischer oder eukaryontischer Organismus nach Anspruch 19, wobei es sich um einen Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* handelt.
- 20 21. Transgener prokaryontischer oder eukaryontischer Organismus nach Anspruch 19, wobei es sich um eine Pflanze ausgewählt aus der Gruppe der Gattung der Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Olive, Sesam, Haselnuss, Mandel, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Salat, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Hirse, Triticale, Reis, Gerste, Maniok, Kartoffel, Zuckerrübe, Futterrübe, Aubergine, Tomate, Erbse, Alfalfa sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte handelt.
- 25 22. Verwendung der transgenen Organismen gemäß den Ansprüchen 18 bis 21 oder einer Aminosäure hergestellt nach einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 15 zur Herstellung eines Futtermittel- oder Nahrungsmittel, zur Herstellung von Kosmetika oder Pharmazeutika.
- 30 23. Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe der Sequenzen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10.

Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen.

- 5 Weiterhin betrifft die Erfindung Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und transgene Organismen sowie deren Verwendung.

- 10 Aminosäuren bilden die grundlegende Struktureinheit sämtlicher Proteine und sind somit für die normale Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt, dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen [siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)]. Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen
- 15 vorfindet. Biosynthese- und Abbauwege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthese mit der Ernährung aufgenommen werden
- 20 müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.
- 25 Aminosäuren werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik-, pharmazeutischen und chemischen Industrie. So wird L-Glutaminsäure beispielsweise in Infusionslösungen verwendet. Aminosäuren wie D,L-Methionin, L-Lysin oder L-Threonin werden in der Futtermittelindustrie verwendet. Von besonderer Wichtigkeit für die Ernährung von Menschen und vielen Nutztieren sind die essentiellen Aminosäuren Valin,
- 30 Leucin, Isoleucin, Lysin, Threonin, Methionin, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. So ist Lysin beispielsweise nicht nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. In Pflanzen, wie Mais oder Weizen, ist L-Lysin die limitierende Aminosäure, das heißt um eine optimale Ausnutzung derartiger Pflanzennahrung zu ermöglichen, ist es sinnvoll die Nahrung oder das Futtermittel mit L-Lysin zu
- 35 supplementieren. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatriumglutamat,

2

MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze [Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim]. Außerdem eignen sich Aminosäuren für die chemischen Industrie als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Jahresproduktion von Aminosäuren beläuft sich derzeit auf über 1 Mio. t/a mit einem Marktwert von über 2 Mrd. US-\$. Ihre Produktion erfolgt heutzutage durch vier konkurrierende Verfahren:

1. Extraktion aus Proteinhydrolysaten beispielsweise von L-Cystin, L-Leucin oder L-Tyrosin,
 2. chemische Synthese beispielsweise von D,L-Methionin,
 3. Umwandlung chemischer Vorstufen im Enzym- oder Zellreaktor beispielsweise L-Phenylalanin und
 4. fermentative Herstellung mittels Anzucht von Bakterien im Großmaßstab, die entwickelt wurden, um große Mengen des jeweils gewünschten Moleküls zu produzieren und sezernieren. Ein für diesen Zweck besonders geeigneter Organismus ist *Corynebacterium glutamicum*, der beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin oder L-Glutaminsäure verwendet wird. Weitere fermentativ hergestellte Aminosäuren sind beispielsweise L-Threonin, L-Tryptophan, L-Asparaginsäure und L-Phenylalanin.
- Die Biosynthese der natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden [für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 – 606]. Glutaminsäure wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf Tetra-

3

hydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glycolyse- und Pentosephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin lässt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Asparaginsäure wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citronensäure-Zyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Asparaginsäure produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der bestehenden Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen. Auch Bakterien anderer Gattungen wie *Escherichia* oder *Bacillus* werden für die Herstellung von Aminosäuren verwendet.

Über Stammselektion sind eine Reihe von Mutantenstämmen entwickelt worden, die ein Sortiment wünschenswerter Verbindungen aus der Reihe der schwefelhaltigen Feinchemikalien produzieren. Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen hinsichtlich der Produktion eines bestimmten Moleküls werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Dies ist jedoch ein zeitaufwendiges und schwieriges Verfahren. EP-A-0 066 129 beschreibt beispielhaft ein Verfahren zur Herstellung von Threonin mit *Corynebakterien*. Entsprechende Verfahren wurden auch zur Herstellung von Methionin bearbeitet. Auf diese Weise erhält man z.B. Stämme, die resistent gegen Antimetabolite, wie z. B. die Methionin-Analoga α -Methyl-Methionin, Ethionin, Norleucin, N-Acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-Amino-5-heptenoisäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-Carboxylsäure oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und schwefelhaltige Feinchemikalien, wie z. B. L-Methionin, produzieren. Derartige zur Herstellung von Methionin entwickelte Verfahren haben den Nachteil, dass sie für eine wirtschaftliche Nutzung zu geringe Ausbeuten aufweisen und deshalb gegenüber der chemischen Synthese nicht konkurrenzfähig sind.

Von Zeh et al. (Plant Physiol., Vol. 127, 2001: 792-802) wird eine Erhöhung des Methioningehalts in Kartoffelpflanzen durch die Hemmung der Threoninsynthese über die sogenannte Antisense-Technologie beschrieben. Dies führt zu einer verringerten Aktivität der Threoninsynthese, ohne dass der Threoningehalt in den Pflanzen reduziert wird. Von Nachteil ist, dass diese Technologie sehr komplex ist und in einem technischen Maßstab nicht oder nur sehr schlecht verwendet werden kann. Außerdem muss die Hemmung der Enzymaktivität sehr differenziert erfolgen, da sonst eine Auxotrophie für die Aminosäure auftritt und die Pflanze nicht mehr wächst.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so dass Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden [für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea Cycle"; S 495-516 (1988)]. Die Zelle ist zwar in der Lage, unerwünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, dass die Aminosäure-Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet [für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)]. Der Ausstoß einer bestimmten Aminosäure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

Verbesserungen der fermentativen Herstellung von Feinchemikalien korrelieren in der Regel mit Verbesserungen von Stoffflüssen und Ausbeuten. Wichtig dabei ist es, Zwischen- oder Endprodukthemmungen wichtiger Syntheseeenzyme zu verhindern oder zu verringern. Ebenso ist es von Vorteil, Abflüsse des Kohlenstoffflusses in ungewünschte Produkte oder Seitenprodukte zu verhindern oder zu verringern.

Die essentiellen Aminosäuren sind wie oben beschrieben für den Menschen und viele Säugetiere beispielsweise für Nutztiere notwendig. L-Methionin ist dabei wichtig als Methylgruppen-Lieferant für die Biosynthese z.B. von Cholin, Creatin, Adrenalin, Basen u. RNS u. DNS, Histidin sowie für die Transmethylierung nach Bildung von S-Adenosylmethionin oder als Sulfhydrylgruppen-Lieferant für die Cysten-Bildung.

L-Methionin scheint außerdem einen positiven Einfluss bei Depressionen zu haben

5

Die Verbesserung der Qualität von Nahrungs- und Futtermitteln ist daher eine wichtige Aufgabe der Nahrungs- und Futtermittelindustrie. Diese ist notwendig, da beispielsweise in Pflanzen Aminosäuren wie L-Lysin und L-Tryptophan für die Versorgung von Säugetieren limitierend sind. Besonders vorteilhaft für die Qualität von Nahrungs- und Futtermittel ist eine möglichst ausge-

5 wogene Aminosäurebalance, da ein hoher Überschuss an einer Aminosäure wie beispielsweise L-Lysin ab einer bestimmten Konzentration im Lebensmittel keinen weiteren positiven Effekt auf die Verwertung des Lebensmittels hat, da andere Aminosäuren plötzlich limitierend werden. Eine weitere Steigerung der Qualität ist nur über Zugabe weiterer unter diesen Bedingungen limitierenden Aminosäuren möglich. So ist in wachsenden Schweinen zunächst Lysin limitierend.

10 Ist ausreichend Lysin im Futtermittel enthalten, so wird Threonin zur limitierenden Aminosäure. Wird auch Threonin ausreichend zum Futtermittel gegeben, so ist als nächste Aminosäure Tryptophan limitiert. Für Hühner ist die Reihenfolge der ersten drei limitierenden Aminosäuren wie folgt: Methionin, Lysin und dann Threonin. Dies zeigt, dass diese Aminosäuren für eine optimale Ernährung wichtige Funktion haben und in einem ausgewogenen Verhältnis in der Nahrung

15 vorliegen müssen.

Eine gezielte Gabe der limitierenden Aminosäure in Form synthetischer Produkte muss deshalb sehr vorsichtig vorgenommen werden, um Aminosäure-Imbalancen zu vermeiden. Durch Zugabe einer essentiellen Aminosäure wird nämlich die Proteinverdauung angeregt, was besonders Mangelsituationen bei der in zweiter oder dritter Stelle limitierenden Aminosäure hervorrufen

20 kann.

So hat man bei Fütterungsversuchen beispielsweise von Casein durch zusätzliche Gaben von Methionin, das im Casein limitiert ist, Leberverfettungen festgestellt, die erst nach zusätzlicher Gabe von Tryptophan behoben werden konnten.

Für eine hohe Nahrungs- und Futtermittelqualität ist deshalb die je nach Organismus ausgewogene Zugabe mehrerer Aminosäuren notwendig. Die vorgenannten fermentativen sowie anderen Syntheseverfahren ermöglichen in der Regel nur den Zugang zu einer einzelnen Aminosäure.

25

Es bestand daher die Aufgabe für die vorliegende Erfindung ein kostengünstiges Verfahren zur Synthese von Aminosäuren vorteilhaft der essentiellen Aminosäuren L-Lysin und L-Methionin zu

30 entwickeln, die zu den zwei häufigsten limitierenden Aminosäuren gehören.

Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren folgende Schritte umfasst gelöst:

- a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Threonin-abbauendes Protein codiert, oder
- b) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz, die den Threoninabbau in den transgenen Organismen erhöht und
- 5 c) Expression einer unter (a) oder (b) genannten Nukleinsäuresequenz im transgenen Organismus.

Unter Threonin-abbauenden Proteinen sind vorteilhaft Proteine zu verstehen wie die Threonin-Aldolase oder die Serin-Hydroxymethyltransferase, die Threonin zu Acetaldehyd und Glycin umsetzen, die Threonindehydrogenase, die unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ Threonin zu L-2-Amino-Acetoacetat umsetzt, oder die Threonindehydratase, die Threonin unter NH_3 und Wasserabspaltung zu Oxobutyrate umsetzt. Vorteilhaft wird als Threonin-abbauende Aktivität die Threonin-Aldolase im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet. Die Aktivität der vorgenannten Proteine und/oder der für sie codierenden Nukleinsäuresequenzen kann auf verschiedenen Wegen erhöht werden. Vorteilhaft werden die Nukleinsäuresequenzen in einem Organismus exprimiert und so die Aktivität in einem Organismus über die Genkopienzahl erhöht und/oder aber es wird die Stabilität der exprimierten mRNA erhöht und/oder es wird die Stabilität des Genprodukts erhöht. Weiterhin kann die Regulation der vorgenannten Nukleinsäuresequenzen verändert werden, so dass die Expression der Gene erhöht wird. Dies kann vorteilhaft durch heterologe Regulationssequenzen oder durch Veränderung z.B. über Mutation der vorhandenen natürlichen Regulationssequenzen erreicht werden. Beide vorteilhaften Methoden können auch miteinander kombiniert werden.

In einer vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass im oben genannten Verfahrensschritt (a) eine Nukleinsäuresequenz, eingebracht wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuresequenzen

- i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz;
- ii) einer Nukleinsäuresequenz, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz erhalten wird und
- 30 iii) eines Derivats der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid codiert, welches mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene zu der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist, ohne dass die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist; und

7

diese Nukleinsäuresequenzen anschließend in einem transgenen Organismus exprimiert werden.

Diese vorteilhafte Ausführungsform des Verfahrens zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen stellt sich damit wie folgt dar:

- 5 a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe
- i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz;
 - ii) einer Nukleinsäuresequenz, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz erhalten wird und
 - 10 iii) eines Derivats der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid codiert, welches mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene zu der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist, ohne dass die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist; und
- 15 b) Expression einer unter (a) genannten Nukleinsäuresequenz in einem transgenen Organismus.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass im oben genannten Verfahrensschritt (a) eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuresequenzen

- 20 i) einer Nukleinsäuresequenz, die sich aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 dargestellten Aminosäuresequenz erhalten wird;
- 25 ii) eines Derivats der Nukleinsäuresequenz, die durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 dargestellten Aminosäuresequenz erhalten wird und welche mindestens 70 % Homologie auf Aminosäureebene zu den vor genannten Aminosäuresequenzen aufweist, ohne dass die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist; eingebracht wird und
- 30 anschließend diese Nukleinsäuresequenzen in einem transgenen Organismus exprimiert werden.

Nach dem Einbringen und der Expression der in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen wird der transgene Organismus vorteilhaft kultiviert und anschließend geerntet. Im Falle, dass es sich bei dem transgenen Organismus um einen Mikroorganismus wie einem eukaryotischen Organismus wie einem Pilz, einer Alge oder einer Hefe oder einem prokaryotischen Organismus wie einem Bakterium wie einem Bakterium der Gattungen Escherichia, Bacillus, Corynebacterium oder Brevibacterium handelt wird dieser in einem dem Fachmann bekannten und je nach Organismus üblichen Fest- oder Flüssigmedium kultiviert. Nach Anzucht werden die Organismen geerntet. Die Aminosäuren können dann direkt in Nahrungsmittel oder Futtermittel oder für sonstige Anwendungen beispielsweise gemäß den in EP-B-0 533 039 oder EP-A-0 615 693 gemachten Offenbarungen, auf die hier ausdrücklich verwiesen wird, weiter verarbeitet werden oder aber weiter in üblicherweise über Extraktion und Fällung oder über Ionenaustauscher weiter aufgereinigt werden. Produkte dieser unterschiedlichen Aufarbeitungen sind Aminosäuren oder Aminosäurezusammensetzungen, die noch Anteile der Fermentationsbrühe und der Zellen in unterschiedlichen Mengen vorteilhaft im Bereich von 0 bis 100 Gew.-%, bevorzugt von 1 bis 80 % Gew.-%, besonders bevorzugt zwischen 5 und 50 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt zwischen 5 und 40 Gew.-% enthalten.

In einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Organismus um eine Pflanze, deren Aminosäuregehalt durch die eingebrachte Nukleinsäuresequenz vorteilhaft verändert wird. Dies ist für Pflanzenzüchter wichtig, da beispielsweise für monogastrische Tiere der Nährwert von Pflanzen durch einige essentielle Aminosäuren wie Lysin oder Methionin limitiert ist. Diese so hergestellte transgene Pflanze wird nach dem Einbringen der Nukleinsäure auf oder in einem Nährmedium oder aber in Erdkultur angezogen und anschließend geerntet. Die Pflanzen können dann direkt als Lebens- oder Futtermittel verwendet werden oder aber weiter verarbeitet werden. Auch in diesem Fall können die Aminosäuren in üblicher Weise über Extraktion und Fällung oder über Ionenaustauscher weiter aufgereinigt werden. Produkte dieser unterschiedlichen Aufarbeitungen sind Aminosäuren oder Aminosäurezusammensetzungen, die noch Anteile der Pflanze in unterschiedlichen Mengen vorteilhaft im Bereich von 0 bis 100 Gew.-%, bevorzugt von 20 bis 80 % Gew.-%, besonders bevorzugt zwischen 50 und 90 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt zwischen 80 und 99 Gew.-% enthalten. Vorteilhaft werden die Pflanzen direkt ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Organismus um einen Mikroorganismus wie Bakterien der Gattungen Corynebacterium, Brevibacterium, Escherichia oder Bacillus. Diese Mikroorganismen werden vorteilhaft in einem fermentativen Verfahren verwendet.

Vorteilhaft werden in den Organismen neben der in SEQ ID NO: 1 genannten Sequenz, den Nukleinsäuresequenzen, die sich von den Sequenzen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID

NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 ableiten lassen, oder deren Derivaten noch weitere Gene exprimiert und/oder mutiert. Besonders vorteilhaft wird in den Organismen wie Pflanzen oder Mikroorganismen zusätzlich wenigstens ein weiteres Gen des Biosyntheseweges des L-Lysins, L-Threonins und/oder L-Methionins
5 exprimiert und/oder es werden Gene exprimiert, deren Regulation verändert wurden. Vorteilhaft kann auch die Regulation der natürlichen Gene verändert worden sein, so dass das Gen und/oder dessen Genprodukt nicht mehr der den in Organismen vorhandenen Regelkreisläufen unterliegt. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Synthese der gewünschten Aminosäuren, da z.B. Feedback-Regulationen nicht mehr oder nicht mehr in dem Maße vorhanden sind.

- 10 Gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden deshalb Organismen vorteilhaft Bakterien der Gattungen *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus* oder *Escherichia* oder Pflanzen angezogen, in denen gleichzeitig wenigstens eine Nukleinsäure bzw. eines der Gene, die für Proteine kodieren, ausgewählt aus der Gruppe der Genprodukte bestehend aus der Aspartatkinase (lysC), der Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (asd), der Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (gap), der 3-Phosphoglycerat Kinase (pgk), der Pyruvat Carboxylase (pyc), der Triosephosphat Isomerase (tpi), der Homoserin O-Acetyltransferase (metA), der Cystahionin-γ-Synthase (metB), der Cystahionin-gamma-Lyase (metC), Cystahionin-β-Lyase, der Methionin-Synthase (methH), der Serin-Hydroxymethyltransferase (glyA), der O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase (metY), der Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase (metF), der
15 Phosphoserin-Aminotransferase (serC), der Phosphoserin-Phosphatase (serB), der Serine Acetyl-Transferase (cysE), der Cystein-Synthase (cysK), der Homoserin-Dehydrogenase (hom) und S-Adenosylmethionin Synthase (metX) überexprimiert ist.

- In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden im Verfahren Organismen verwendet, in denen gleichzeitig wenigstens eines der vorgenannten
25 Gene bzw. eine der vorgenannten Nukleinsäuren mutiert ist, so dass die korrespondierenden Proteine, verglichen mit den nicht mutierten Proteinen, in geringerem Maße oder gar nicht durch Stoffwechselmetabolite in ihrer Aktivität beeinflusst werden und dass insbesondere die erfindungsgemäße Produktion der Aminosäuren nicht beeinträchtigt wird, oder so dass ihre spezifische enzymatische Aktivität gesteigert wird. Unter geringer Beeinflussung ist dabei eine gegenüber dem Ausgangsorganismus um mindestens 10 %, vorteilhaft mindestens 20, 30 oder 40 %,
30 besonders vorteilhaft um mindestens 50, 60 oder 70 % geringere Regulierung der Enzymaktivität und damit um diese genannten Zahlen erhöhte Aktivität des Enzyms gegenüber dem Ausgangsorganismus zu verstehen. Unter Steigerung der enzymatischen Aktivität ist eine gegenüber dem Ausgangsorganismus um mindestens 10 %, vorteilhaft mindestens 20, 30 oder 40 %,
35 besonders vorteilhaft um mindestens 50, 60 oder 70 % gesteigerte enzymatische Aktivität zu verstehen. Dies führt zu einer erhöhten Produktivität der gewünschten Aminosäure oder der gewünschten Aminosäuren.

10

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden im Verfahren Organismen verwendet, in denen gleichzeitig wenigstens eines der Gene, ausgewählt unter der Homoserine-Kinase (thrB), der Threonin Dehydratase (ilvA), der Threonin Synthase (thrC), der Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase (ddh), der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (pck), der Glucose-6-Phosphat-6-Isomerase (pgi), der Pyruvat-Oxidase (poxB), der Dihydrodipicolinat Synthase (dapA), der Dihydrodipicolinat Reduktase (dapB) und der Diaminopicolinat Decarboxylase (lysA) abgeschwächt ist, insbesondere durch Verringerung der Expressionsrate des korrespondierenden Gens.

- 10 Gemäß einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden im Verfahren Organismen verwendet, in denen gleichzeitig wenigstens eine der vorgenannten Nukleinsäuren bzw. der vorgenannten Gene so mutiert ist, dass die enzymatische Aktivität des korrespondierenden Proteins teilweise verringert wird oder vollständig blockiert ist. Unter Verringerung der enzymatischen Aktivität ist eine gegenüber dem Ausgangsorganismus um mindestens 10 %, vorteilhaft mindestens 20, 30 oder 40 %, besonders vorteilhaft um mindestens 50, 60 oder 70 % verringerte enzymatische Aktivität zu verstehen.

Enzyme können derart in ihrer Aktivität beeinflusst werden; dass es zu einer Verringerung oder Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, oder zu einer Veränderung (Verringerung oder Erhöhung) der Affinität gegenüber dem Substrat kommt.

- 20 Vorzugsweise werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren Mikroorganismen der Gattungen Corynebacterium oder Brevibacterium oder Pflanzen eingesetzt.

- 25 Auch chemisch reine Aminosäuren oder Aminosäurezusammensetzungen sind nach den vorbeschriebenen Verfahren darstellbar. Dazu werden die Aminosäuren oder die Aminosäurezusammensetzungen aus dem Organismus wie den Mikroorganismen oder den Pflanzen oder dem Kulturmedium, in dem oder auf dem die Organismen angezogen wurden, oder aus dem Organismus und dem Kulturmedium in bekannter Weise isoliert. Diese chemisch reinen Aminosäuren oder Aminosäurezusammensetzungen sind für Anwendungen im Bereich der Lebensmittelindustrie, der Kosmetikindustrie oder der Pharmaindustrie vorteilhaft.

Vorteilhaft werden nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Aminosäuren wie Methionin, Lysin oder deren Mischungen bevorzugt Methionin hergestellt.

- 30 Dabei können im erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannten Aminosäuren mindestens um den Faktor 3, bevorzugt mindestens um den Faktor 5, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 10, ganz besonders bevorzugt um mindestens den Faktor 50 gegenüber dem Wildtyp der Organismen erhöht werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die hergestellten Aminosäuren in den im Verfahren verwendeten Organismen prinzipiell auf zwei Arten erhöht werden. Es kann vorteilhaft der Pool an freien Aminosäuren und/oder der Anteil der über das Verfahren hergestellten Aminosäuren in den Proteinen erhöht werden. Vorteilhaft wird durch das erfindungsgemäße Verfahren der Pool an freien Aminosäuren in den transgenen Organismen erhöht. Im vorteilhaften Falle der Fermentation von Mikroorganismen werden die Aminosäuren im Medium angereichert.

Prinzipiell sind für das erfindungsgemäße Verfahren alle eukaryotischen oder prokaryotischen Organismen geeignet, die in der Lage sind, Methionin und/oder Lysin zu synthetisieren. Vorteilhaft handelt es sich bei den im Verfahren verwendeten Organismen um Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Hefen oder Algen oder Pflanzen wie dicotyledone oder monocotyledone Pflanzen wie Pflanzen der Familien Aceraceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cactaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Salicaceae, Solanaceae, Arecaceae, Bromeliaceae, Cyperaceae, Iridaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Gentianaceae, Labiaceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae, Caprifoliaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Ericaceae, Polygonaceae, Violaceae, Juncaceae oder Poaceae bevorzugt einer Pflanze ausgewählt aus den Gruppe der Familien Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Solanaceae, Liliaceae oder Poaceae.

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren transgene Mikroorganismen wie Pilze wie die Gattung *Claviceps* oder *Aspergillus* oder gram-positive Bakterien wie die Gattungen *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Caseobacter* oder *Arthrobacter* oder gram-negative Bakterien wie die Gattungen *Escherichia*, *Flavobacterium* oder *Salmonella* oder Hefen wie die Gattungen *Rhodotorula*, *Hansenula* oder *Candida*. Besonders vorteilhaft sind Organismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Candida*, *Claviceps* oder *Flavobacterium*. Gans besonders vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Mikroorganismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen und Arten bestehend aus *Hansenula anomala*, *Candida utilis*, *Claviceps purpurea*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Brevibacterium albidum*, *Brevibacterium album*, *Brevibacterium cerinum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium glutamigenes*, *Brevibacterium iodinum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium saccharolyticum*, *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum* (= *Micrococcus glutamicum*), *Corynebacterium melassecola*, *Corynebacterium* sp. oder *Escherichia coli* speziell *Escherichia coli* K12 und dessen beschriebene Stämme verwendet.

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren transgene Pflanze ausgewählt aus der Gruppe der Nutzpflanzen verwendet. Wie Pflanzen ausgewählt aus der Gruppe der Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Olive, Sesam, Haselnuss, Mandel, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Hirse, Triticale, Reis, Gerste, Maniok, Kartoffel, Zuckerrübe, Futterrübe, Aubergine, sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte, Ölpalme, Gemüse (Kohlgemüse, Wurzelgemüse, Knollengemüse, Hülsengemüse, Fruchtgemüse, Zwiebelgemüse, Blatt- und Stielgemüse), Buchweizen, Topinambur, Ackerbohne, Wicken, Linse, Buschbohne, Alfaalfa, Lupine, Klee und Luzerne.

- 10 Die im Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen verwendete(n) Nukleinsäuresequenz(en) stammen vorteilhaft aus einem Eukaryont (für die Erfindung soll der Plural den Singular und umgekehrt umfassen), können aber auch aus einem Prokaryont stammen. Vorteilhaft stammen die Nukleinsäuresequenzen aus einer Pflanze wie einer Pflanze ausgewählt aus den Familien Aceraceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cactaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Salicaceae, Solanaceae, Arecaceae, Bromeliaceae, Cyperaceae, Iridaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Gentianaceae, Labiaceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae, Carifoliaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Ericaceae, Polygonaceae, Violaceae, Juncaceae oder Poaceae bevorzugt einer Pflanze ausgewählt aus den Gruppe der Familien Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Solanaceae, Liliaceae oder Poaceae; einem Pilz wie den Gattungen Aspergillus, Penicillium oder Claviceps oder einer Hefe wie den Gattungen Pichia, Torulopsis, Hansenula, Schizosaccharomyces, Candida, Rhodotorula oder Saccharomyces. Besonders vorteilhaft stammen die Sequenzen aus Hefen wie den Gattungen Pichia, Torulopsis, Hansenula, Schizosaccharomyces, Candida, Rhodotorula oder Saccharomyces, ganz besonders vorteilhaft aus der Hefe der Familie Saccharomycetaceae wie der vorteilhaften Gattung Saccharomyces und der besonders vorteilhaften Gattung und Art Saccharomyces cerevisiae.

- 30 Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 kodieren für eine Threonin-Aldolase. Diese Aldolase zeigt die höchste Homologie zum GLY1 Protein von *A. gossypii* [Eremothecium ashbii, Eremothecium gossypii] (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AJ005442, CAA06545.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 76 %). Darüber hinaus lassen sich Homologien zu einer Vielzahl von Nukleinsäuren finden. Die Threonin-Aldolase von Hefen wie *Candida albicans* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AF009967, AAB64198.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 56 %), von *Schizosaccharomyces pombe* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. Z99163, CAB16235.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 49 %), oder von Bakterien wie *Aeromonas jandaei* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AF169478, AAD47837.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 41 %), *Pseudomonas aeruginosa* (EMBL-Datenbank. Accession Nr.

AF011922, AAC46016.1, , Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 38 %), *Vibrio cholerae* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AE004405, AAF96663.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 38 %), *Escherichia coli* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AB005050, BAA20882.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 38 %), *Deinococcus radiodurans* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AE001978, AAF10885.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 38 %), *Bacillus halodurans* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AP001518, BAB07002.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 34 %), *Halobacterium* sp. (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AE005124, AAG20528.1), *Thermotoga maritima* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AE001813, AAD36809.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 40 %) oder den Pflanzen *Arabidopsis thaliana* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AF325033, AAG40385.1, AC022287, AAF63783.1, AC003981, AAC14037.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von jeweils 40, 42 bzw. 37 %) oder von nicht-humanen Tieren wie *Caenorhabditis elegans* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. Z70309, CAA94358.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 41 %) oder *Drosophila melanogaster* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AE003744, AAF56152.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 39 %) oder die Alaninracemase von Pilzen wie *Cochliobolus carbonum/Bipolaris zeicola* (EMBL-Datenbank. Accession Nr. AF169478, AAD47837.1, Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 38 %). Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleinsäuresequenzen und durch diese codierte Proteine verwendet, die aus Hefen der Gattungen *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* oder *Saccharomyces* stammen. Weiterhin zeigt die vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Aldolase eine hohe Homologie zu den unter SEQ ID NO: 3 (Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 35 %), SEQ ID NO: 4 (Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 35 %), SEQ ID NO: 5 (Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 27 %), SEQ ID NO: 6 (Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 43 %), SEQ ID NO: 7 (Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 39 %), SEQ ID NO: 8 (Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 32 %), SEQ ID NO: 9 (Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 35 %) oder SEQ ID NO: 10 (Identität auf Aminosäureebene zu SEQ ID NO: 1 von 36 %) genannten Sequenzen, die aus Soja (SEQ ID NO: 3 – 5), Reis (SEQ ID NO: 6 und 7) bzw. aus Canola (SEQ ID NO: 8 – 10) stammen. Vorteilhaft können im Verfahren Nukleinsäuresequenzen verwendet werden, die sich von den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 ableiten.

Für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Aldolase-Aktivität codieren, lassen sich aus allgemein zugänglich Datenbanken ermitteln. Insbesondere sind hier allgemeine Gen-Datenbanken zu nennen, wie die EMBL-Datenbank (Stoesser G. et al., *Nucleic Acids Res* 2001, Vol. 29, 17-21), die GenBank-Datenbank (Benson

D.A. et al., Nucleic Acids Res 2000, Vol. 28,15-18), oder die PIR-Datenbank (Barker W. C. et al., Nucleic Acids Res. 1999, Vol. 27, 39-43).

Weiterhin können Organismen-spezifische Gen-Datenbanken zur Ermittlung vorteilhafter Sequenzen verwendet werden, so z.B. vorteilhaft für Hefe die SGD-Datenbank (Cherry J. M. et al., Nucleic Acids Res. 1998, Vol. 26, 73-80) oder die MIPS-Datenbank (Mewes H.W. et al., Nucleic Acids Res. 1999, Vol. 27, 44-48), für *E. coli* die GenProtEC-Datenbank (<http://web.bham.ac.uk/bcm4ght6/res.html>), für Arabidopsis die TAIR-Datenbank (Huala, E. et al., Nucleic Acids Res. 2001 Vol. 29(1), 102-5) oder die MIPS-Datenbank.

10 Um das Einbringen der Nukleinsäuresequenzen und die Expression der Sequenzen in den transgenen Organismen, die im Verfahren verwendet werden, zu verbessern, werden die Nukleinsäuresequenzen in ein Nukleinsäurekonstrukt und/oder einen Vektor eingebaut. Zusätzlich zu den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten oben beschriebenen Sequenzen können im Nukleinsäurekonstrukt bzw. im Vektor noch weitere Nukleinsäuresequenzen vorteilhaft von Biosynthesegenen der im Verfahren hergestellten Aminosäure vorhanden sein, die zusammen in 15 den Organismus eingebracht werden. Diese zusätzlichen Sequenzen können aber auch direkt oder über andere getrennte Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren in die Organismen eingebracht werden.

Bei den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Aldolase-Aktivität codieren.

20 Unter Nukleinsäuren sind im erfindungsgemäßen Verfahren DNA oder RNA-Sequenzen, die einzel- oder doppelsträngig sein oder gegebenenfalls synthetische, nicht natürliche oder veränderte, in DNA oder RNA einbaubare Nukleotidbasen aufweisen können, zu verstehen.

Der Begriff "Expression" meint die Transkription und/oder Translation eines kodogenen Genabschnitts bzw. Gens. In der Regel ist das resultierende Produkt ein Protein. Zu den Produkten gehören aber auch funktionelle RNAs wie z.B. Ribozyme. Die Expression kann systemisch oder 25 lokal, z.B. auf bestimmte Zelltypen, Gewebe oder Organe beschränkt, erfolgen.

Die Expressionsprodukte der Nukleinsäuren z.B. der kodogenen Genabschnitte (ORFs) und ihrer regulatorischen Elemente lassen sich durch ihre Funktion kennzeichnen. Hierzu gehören beispielsweise Funktionen in den Bereichen Metabolismus, Energie, Transkription, Proteinsynthese, 30 Proteinprozessierung, zellulärer Transport und Transportmechanismen, zelluläre Kommunikation und Signaltransduktion, Zellrettung, Zellverteidigung und Zellvirulenz, Regulation der zellulären Umgebung und Interaktion der Zelle mit ihrer Umgebung, Zellschicksal, transponierbare Elemente, virale Proteine und Plasmidproteine, zelluläre Organisationskontrolle, subzelluläre Lokalisation, Regulation der Proteinaktivität, Proteine mit Bindungsfunktion oder Cofaktor-

Erfordernis und Transporterleichterung. Gene gleicher Funktion werden zu sogenannten funktionellen Genfamilien zusammengefasst.

5 Durch die biologische Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit Threonin-Aldolase-Aktivität codieren, können unterschiedliche Aminosäuren hergestellt bzw. deren Herstellung verbessert und/oder gesteigert werden. Je nach Auswahl des für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Organismus beispielsweise eines Mikroorganismus oder einer Pflanze lassen sich Mischungen der verschiedenen Aminosäuren herstellen.

10 Im erfindungsgemäßen Verfahren sind unter transgenen Organismen wenn es sich um Pflanzen handelt auch Pflanzenzellen, -gewebe, -organe wie Wurzel, Spross, Stängel, Same, Blüte, Knolle oder Blatt oder ganze Pflanzen zu verstehen, die zur Herstellung von Aminosäuren angezüchtet werden. Unter Anzucht ist beispielsweise die Kultivierung der transgenen Pflanzenzellen, -gewebe oder -organe auf oder in einem Nährmedium oder der ganzen Pflanze auf bzw. in einem Substrat beispielsweise in Hydrokultur, Blumentopferde oder auf einem Ackerboden zu verstehen.

15 Werden Pflanzen im erfindungsgemäßen Verfahren als Spenderorganismus gewählt, so kann diese Pflanze im Prinzip eine beliebige phylogenetische Verwandtschaft mit der Empfängerpflanze aufweisen. So können Spender- und Empfängerpflanze derselben Familie, Gattung, Spezies, Sorte oder Linie angehören, wobei sich eine zunehmende Homologie zwischen den integrierenden Nukleinsäuren und entsprechenden Teilen des Genoms der Empfängerpflanze ergibt. Gleiches gilt auch für Mikroorganismen als Spender- und Empfängerorganismus.

25 Vorteilhaft wird im erfindungsgemäßen Verfahren eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich von den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 ableiten, oder deren Derivat oder Homologe, die für Polypeptide codieren, die noch die enzymatische Aktivität bzw. biologische Aktivität besitzen, verwendet. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination in Expressionskonstrukte cloniert. Diese Expressionskonstrukte ermöglichen eine optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten Aminosäuren.

30 Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle, die die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für ein Enzym mit Threonin-Aldolase-Aktivität codieren, enthält, wobei eine Zelle mit den Nukleinsäuresequenzen, einem Genkonstrukt (= Nukleinsäurekonstrukt) oder einem Vektor, welche die Expression der Aldolase-Nukleinsäure allein oder in Kombination mit anderen Genen bzw. Sequenzen herbeiführen, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses

35

16

Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Aminosäure(n) bzw. des Aminosäuregemisches aus der Kultur und/oder dem Organismus. Die so hergestellte Zelle ist vorteilhaft eine Zelle einer wie oben als vorteilhaft beschriebenen Pflanze oder eines Mikroorganismus.

- Unter transgenem Organismus wie einer Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, dass die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet aber auch, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder dass die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Die Expression kann dabei transient oder von einer stabil im Genom integrierten Sequenz aus erfolgen. Bevorzugte transgene Pflanzen sind beispielsweise folgende Pflanzen, ausgewählt aus den Familien Aceraceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cactaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Salicaceae, Solanaceae, Arecaceae, Bromeliaceae, Cyperaceae, Iridaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Gentianaceae, Labiaceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae, Carifolaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Ericaceae, Polygonaceae, Violaceae, Juncaceae oder Poaceae bevorzugt einer Pflanze ausgewählt aus den Gruppe der Familien Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Solanaceae, Liliaceae oder Poaceae. Weitere vorteilhafte bevorzugte Pflanzen sind Nutzpflanzen vorteilhaft ausgewählt aus der Gruppe der Gattung der Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Olive, Sesam, Haselnuss, Mandel, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Hirse, Triticale, Reis, Gerste, Maniok, Kartoffel, Zuckerrübe, Aubergine, Alfaalfa sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte, Ölpalme, Gemüse (Kohl Gemüse, Wurzelgemüse, Knollengemüse, Hülsengemüse, Fruchtgemüse, Zwiebelgemüse, Blatt- und Stielgemüse), Buchweizen, Topinambur, Ackerbohne, Wicken, Linse, Buschbohne, Lupine, Klee und Luzerne.
- Der erfindungsgemäß verwendete Begriff "transgene Pflanze" bezieht sich auch auf die Nachkommenschaft einer transgenen Pflanze, z.B. die T_1 -, T_2 -, T_3 - und nachfolgende Pflanzengenerationen oder die BC_1 -, BC_2 -, BC_3 - und nachfolgende Pflanzengenerationen. So können die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen aufgezogen und mit sich selbst oder anderen Individuen gekreuzt werden, um weitere erfindungsgemäße transgene Pflanzen zu erhalten. Auch können transgene Pflanzen durch vegetative Propagation transgener Pflanzenzellen erhalten werden. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch von einer erfindungsgemäßen Population transgener Pflanzen ableitbares transgenes pflanzliches Material. Hierzu gehören Pflanzenzel-

len und bestimmte Gewebe, Organe und Teile von Pflanzen in all ihren Erscheinungsformen, wie Samen, Blätter, Antheren, Fasern, Wurzeln, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotyledonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe und Zellkulturen, das von der eigentlichen transgenen Pflanze abgeleitet ist und/oder dazu verwendet werden kann, die transgene Pflanze hervorzubringen.

Transgene Pflanzen, die die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten Aminosäuren enthalten, können direkt vermarktet werden ohne die synthetisierten Verbindungen zu isolieren. Unter Pflanzen im erfindungsgemäßen Verfahren sind alle Pflanzenteile, Pflanzenorgane wie Blatt, Stiel, Wurzel, Knollen oder Samen oder die gesamte Pflanze zu verstehen. Der Samen umfasst dabei alle Samenteile wie die Samenhüllen, Epidermis- und Samenzellen, Endosperm oder Embryogewebe. Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Aminosäuren können aber auch aus den Pflanzen in Form ihrer freien Aminosäuren oder gebunden in Proteinen isoliert werden. Durch dieses Verfahren hergestellte Aminosäuren lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder vom Feld ernten. Dies kann über Pressen, Mahlen und/oder Extraktion, Salzfällung und/oder Ionenaustauscherchromatographie der Pflanzenteile bevorzugt der Pflanzensamen, -früchte, -knollen etc. erfolgen.

Auf diese Weise können mehr als 50 Gew.-%, vorteilhaft mehr als 60 Gew.-%, bevorzugt mehr als 70 Gew.-%, besonders bevorzugt mehr als 80 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt mehr als 90 Gew.-% der im Verfahren hergestellten Aminosäuren isoliert werden. Anschließend können die so erhaltenen Aminosäuren ggf. weiter gereinigt, falls gewünscht mit anderen Wirkstoffen wie Vitaminen, Aminosäuren, Kohlenhydraten, Antibiotika etc. abgemischt werden und gegebenenfalls formuliert werden.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung der im Verfahren hergestellten Aminosäuren oder der transgenen Organismen in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren können nach Einbringung in eine Pflanzenzelle bzw. Pflanze entweder im Plastidengenom oder bevorzugt in das Genom der Wirtszelle integriert sein auch eine transiente Expression ist möglich und kann vorteilhaft verwendet werden. Auch eine Produktion durch beispielsweise eine Virusinfektion mit rekombinanten Virus ist prinzipiell möglich, dabei wird vorteilhaft die Expression des Gens bzw. der Gene erhöht. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadeny-

lierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist. Vorteilhaft werden die Nukleinsäuren über Multiexpressionskassetten oder Konstrukte zur multiparallelen Expression von Genen in die Pflanzen gebracht. In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform wird die Nukleinsäuresequenz in einer einfachen Expressionskassette oder einem einfachen Konstrukt, das heißt ohne weitere andere Nukleinsäuresequenzen in die Pflanze eingebracht. Bevorzugt werden heterologe Nukleinsäuresequenzen eingebracht.

Unter der Verwendung von Klonierungsvektoren in Pflanzen und bei der Pflanzentransformation, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jené et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225), lassen sich die Nukleinsäuren zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so dass diese ein besserer oder effizienterer Produzent von den im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Aminosäuren wird. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion der Aminosäuren oder davon abgeleitete Produkte, wie veränderte Proteine, kann durch direkte Wirkung der Manipulation oder eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung des im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Threonin-Aldolase-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Aminosäuren aus einer den transgenen Pflanzen oder den Mikroorganismen wie einer Hefe, einem Pilz oder einem Bakterium aufgrund eines veränderten Proteins direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität des Threonin-Aldolase-Proteins oder -Gens kann erhöht sein, so dass durch diese Enzymaktivität größere Mengen des gewünschten Produkts de novo hergestellt werden, weil den Organismen beispielsweise die eingebrachte enzymatische Aktivität und damit die Fähigkeit zur Erhöhung der Biosynthese vor dem Einbringen des entsprechenden Gens fehlte. Es kann aber auch die Expression des natürlich in den Organismen vorhandenen Gens beispielsweise durch eine veränderte Regulation des Gens erhöht werden oder es kann die Stabilität der mRNA oder des Genproduktes das heißt der Aldolase erhöht werden. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren für die Synthese der Aminosäuren nützlichen Enzymen aus dem Biosynthesestoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression ermöglicht.

- Durch das Einbringen eines Threonin-Aldolase-Gens oder mehrerer Aldolase-Gene in einen Organismus allein oder in Kombination mit anderen Genen kann nicht nur der Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht werden, sondern auch eine im Organismus vorhandene Produkt-Zusammensetzung erhöht, verändert oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Im- oder Export von Nährstoffen der Zelle(n), die zur Biosynthese der Aminosäuren nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zelle(n) oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von Aminosäuren, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Durch die Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl von Threonin-Aldolasenukleinsäuresequenzen und/oder weiteren Genen, die an der Biosynthese der Aminosäuren beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau der Aminosäuren beteiligt sind, kann die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Aminosäuren im Wirtsorganismus wie der Pflanzen oder der Mikroorganismen gesteigert werden.
- Durch diese Beeinflussung des Stoffwechsels lassen sich im erfindungsgemäßen Verfahren weitere vorteilhafte schwefelhaltige Verbindungen herstellen, die wenigstens ein Schwefelatom kovalent gebunden enthalten. Beispiele für derartige Verbindungen sind neben Methionin, Homocystein, S-Adenosylmethionin, Cystein, vorteilhaft Methionin und S-Adenosylmethionin.
- Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfassen die Begriffe „L-Methionin“, „Methionin“, „Homocystein“ und „S-Adenosylmethionin“ auch die korrespondierenden Salze, wie z. B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat. Die Bezeichnungen Methionin oder Threonin sollen auch die Bezeichnungen L-Methionin oder L-Threonin mit umfassen.
- Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten isolierten Nukleinsäuremoleküle codieren für Proteine oder Teilen von diesen, wobei die Proteine oder das einzelne Protein oder Teile davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2 ist, so dass das Protein oder der Teil davon eine Threonin-Aldolase-Aktivität beibehält. Vorzugsweise hat das Protein oder der Teil davon, das/der von dem Nukleinsäuremolekül kodiert wird, seine wesentliche enzymatische bzw. biologische Aktivität und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von Aminosäuren in Pflanzen oder Mikroorganismen bzw. allgemein am Pflanzen- oder Mikroorganismenstoffwechsel oder am Transport von Molekülen über Membranen teilzunehmen. Vorteilhaft ist das von den Nukleinsäuremolekülen kodierte Protein zu mindestens etwa 30 %, 35 %, 40 %, 45 % oder 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO: 2. Bevorzugt ist das Protein ein Volllängen-Protein, das im wesentlichen in Teilen homolog zu einer gesamten Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 (die von dem in

20

SEQ ID NO: 1 gezeigten offenen Leserahmen herrührt) ist. Weitere vorteilhafte weitere im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Nukleinsäuresequenzen leiten sich von den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 ab. Vorteilhaft sind die von diesen abgeleiteten

5 Nukleinsäuremoleküle codierten Proteine zu mindestens etwa 70 % oder 75 %, vorzugsweise etwa mindestens 80 % oder 85 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 90 %, 91 %, 92 % oder 94 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu den durch sie codierten Aminosäuresequenzen bzw. einer Aminosäuresequenz der

10 Sequenz SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10. Im Sinne der Erfindung ist unter Homologie oder homolog, Identität oder identisch zu verstehen.

Unter wesentlicher enzymatischer bzw. biologischer Aktivität der verwendeten Enzyme ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenzen mit SEQ ID NO: 1 oder den von den Sequenzen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 abgeleiteten Sequenzen und deren Derivate codierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch mindestens eine enzymatische bzw. biologische

15 Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % und ganz besonders 40 % aufweisen und damit am Stoffwechsel von Aminosäuren in einer Pflanzen- oder Mikroorganismenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei vorteilhaft die Aminosäuren Methionin oder Lysin gemeint sind.

20

Im Verfahren verwendbare Nukleinsäuren stammen vorteilhaft aus Hefen wie der Familie Saccharomycetaceae wie der vorteilhaften Gattung Saccharomyces oder Hefegattungen wie Candida, Hansenula, Rhodotorula oder Schizosaccharomyces und der besonders vorteilhaften Gattung und Art Saccharomyces cerevisiae. Ihre Sequenz ist unter den EMBL-Accession Nummern

25 U18779, L10830 bzw. U00092 in der EMBL-Datenbank als Produkt Gly1p (protein required for glycine prototrophy), CDS complement (14603..15766), mit der Protein ID ="AAB64996.1" und db_xref="GI: 603634" hinterlegt.

Alternativ können im erfindungsgemäßen Verfahren isolierte Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für putative Aldolasen codieren und die an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1

30 oder in einer anderen vorteilhaften Ausführungsform an eine Sequenz, die sich von den Sequenzen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 ableitet, hybridisieren, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Die Hybridisierung sollte vorteilhaft mit Fragmenten von einer Länge von mindestens 200 bp, vorteilhaft mindestens 400 bp, bevorzugt mindestens 600 bp,

35 besonders bevorzugt von mindestens 800 bp, ganz besonders bevorzugt von mindestens 1000 bp durchgeführt werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sollte die

führt werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sollte die Hybridisierung mit der gesamten Nukleinsäuresequenz durchgeführt werden.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt), die die Expression der Nukleinsäuren in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanze oder einem Mikroorganismus ermöglicht, eingebracht.

Zum Einbringen wird der kodogene Genabschnitt vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise unterworfen. Vorzugsweise geht man in Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-Polymerase oder eines Pfu/Taq-DNA-Polymerasegemisches vor. Die Primer werden in Anlehnung an die zu amplifizierende Sequenz gewählt. Zweckmäßigerweise sollten die Primer so gewählt werden, dass das Amplifikat die gesamte kodogene Sequenz vom Start- bis zum Stop-Kodon umfasst. Im Anschluss an die Amplifikation wird das Amplifikat zweckmäßigerweise analysiert. Beispielsweise kann die Analyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung hinsichtlich Qualität und Quantität erfolgen. Im Anschluss kann das Amplifikat nach einem Standardprotokoll gereinigt werden (z.B. Qiagen). Ein Aliquot des gereinigten Amplifikats steht dann für die nachfolgende Klonierung zur Verfügung. Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in bakteriellen Systemen replizierbar sind, also vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in *E. coli* gewährleisten, und die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Zu nennen sind insbesondere verschiedene für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignete, binäre und co-integrierte Vektorsysteme. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobacterium-vermittelte Transformation benötigten vir-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen wie Promotoren und Terminatoren und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen vir-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer vir-Gene, aber keine T-DNA und ein zweiter T-DNA, jedoch kein vir-Gen trägt. Dadurch sind letztere Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und sowohl in *E.-coli* als auch in *Agrobacterium* zu replizieren. Zu diesen binären Vektoren gehören Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451. Für die Vektorpräparation können die Vektoren zunächst mit Restriktionsendonuklease(n) linearisiert und dann in geeigneter Weise enzymatisch modifiziert werden. Im Anschluss wird der Vektor gereinigt und ein Aliquot für die Klonierung eingesetzt. Bei der Klonierung wird das enzymatisch geschnittenen und erforderlichenfalls gereinigten Amplifikat mit ähnlich präparierten Vektorfragmenten mit Einsatz von Ligase kloniert. Dabei kann ein bestimmtes Nukleinsäurekonstrukt bzw. Vektor- oder Plasmidkonstrukt

22

einen oder auch mehrere kodogene Genabschnitte aufweisen. Vorzugsweise sind die kodogenen Genabschnitte in diesen Konstrukten mit regulatorischen Sequenzen funktional verknüpft.

Zu den regulatorischen Sequenzen gehören insbesondere pflanzliche Sequenzen wie die oben beschriebenen Promotoren und Terminatoren. Die Konstrukte lassen sich vorteilhafterweise in

5 Mikroorganismen, insbesondere *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, unter selektiven Bedingungen stabil propagieren und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder andere Mikroorganismen. Gemäß einer besonderen Ausführungsform basieren die Konstrukte auf binären Vektoren (Übersicht zu binären Vektoren in Hellens et al., 2000).

10 Diese beinhalten in der Regel prokaryotische regulatorische Sequenzen, wie Replikationsursprung und Selektionsmarker, zur Vermehrung in Mikroorganismen wie *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, und *Agrobacterium*-T-DNA-Sequenzen zwecks Transfer von DNA in Pflanzengenome. Von der gesamten T-DNA-Sequenz aus *Agrobacterium* wird zumindest die

rechte, etwa 25 Basenpaare umfassende Border-Sequenz benötigt. Gewöhnlich beinhalten die erfindungsgemäßen Vektorkonstrukte T-DNA-Sequenzen sowohl aus dem rechten wie auch aus dem linken Begrenzungsbereich, welche zweckmäßige Erkennungsstellen für ortsspezifisch

15 agierende Enzyme, die wiederum von einem Teil der *vir*-Gene kodiert werden, beinhalten. Geeignete Wirtsorganismen sind dem Fachmann bekannt. Vorteilhafte Organismen sind in dieser Anmeldung weiter oben beschrieben. Hierzu zählen vor allem bakterielle Wirte, von denen einige bereits oben im Rahmen von Spender-Mikroorganismen genannt sind, z.B. Mikroorganismen

20 wie Pilze wie die Gattung *Claviceps* oder *Aspergillus* oder gram-positive Bakterien wie die Gattungen *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Casheobacter* oder *Arthrobacter* oder gram-negative Bakterien wie die Gattungen *Escherichia*, *Flavobacterium* oder *Salmonella* oder Hefen wie die Gattungen *Rhodotorula*, *Hansenula* oder *Candida*. Besonders vorteilhaft sind Organismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen *Cory-*

25 *nebacterium*, *Brevibacterium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Candida*, *Claviceps* oder *Flavobacterium*. Gans besonders vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Mikroorganismen ausgewählt aus der Gruppe der Gattungen und Arten bestehend aus *Hansenula anomala*, *Candida utilis*, *Claviceps purpurea*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Brevibacterium albidum*, *Brevibacterium album*, *Brevibacterium cerinum*, *Brevibacterium*

30 *flavum*, *Brevibacterium glutamigenes*, *Brevibacterium iodinum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium saccharolyticum*, *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum* (= *Micrococcus glutamicum*), *Corynebacterium melassecola*, *Corynebacterium* sp. oder *Escherichia coli*

35 speziell *Escherichia coli* K12 und dessen beschriebene Stämme verwendet. Erfindungsgemäß vorteilhaft bevorzugt sind Wirtsorganismen der Gattung *Escherichia*, insbesondere *Escherichia coli*, und *Agrobacterium*, insbesondere *Agrobacterium tumefaciens* oder Pflanzen ausgewählt

aus den Familien *Aceraceae*, *Anacardiaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Cactaceae*,

23

Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Salicaceae, Solanaceae, Arecaceae, Bromeliaceae, Cyperaceae, Iridaceae, Liliaceae, Orchidaceae, Gentianaceae, Labiaceae, Magnoliaceae, Ranunculaceae, Carifolaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Ericaceae, Polygonaceae, Violaceae, Juncaceae oder Poaceae bevorzugt einer Pflanze ausgewählt aus den Gruppe der Familien Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Rosaceae, Solanaceae, Liliaceae oder Poaceae. Weitere vorteilhafte bevorzugte Pflanzen sind Nutzpflanzen vorteilhaft ausgewählt aus der Gruppe der Gattung der Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Olive, Sesam, Haselnuss, Mandel, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Hirse, Triticale, Reis, Gerste, Maniok, Kartoffel, Zuckerrübe, Futterrübe, Aubergine sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte, Ölpalme, Gemüse (Kohlgemüse, Wurzelgemüse, Knollengemüse, Hülsengemüse, Fruchtgemüse, Zwiebelgemüse, Blatt- und Stielgemüse), Buchweizen, Topinambur, Ackerbohne, Wicken, Linse, , Alfaalfa, Buschbohne, Lupine, Klee und Luzerne. Zum Einbringen der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren in eine Pflanze hat es sich als vorteilhaft erwiesen diese zunächst in einen Zwischenwirt, z.B. ein Bakterium, zu übertragen. Als zweckmäßig hat sich hierbei die Transformation in *E. coli* erwiesen, die in an sich bekannter Weise, z.B. mittels Hitzeschock oder Elektroporation, durchgeführt werden kann. So können die transformierten *E. coli*-Kolonien hinsichtlich der Klonierungseffizienz untersucht werden. Dies kann mit Hilfe einer PCR erfolgen. Dabei kann sowohl die Identität als auch die Integrität des Plasmidkonstrukts anhand einer definierten Kolonienzahl überprüft werden, indem man ein Aliquot der Kolonien besagter PCR unterwirft. Hierfür werden in der Regel universelle, von Vektorsequenzen abgeleitete Primer eingesetzt, wobei der forward-Primer stromaufwärts vom Start-ATG und der reverse-Primer stromabwärts vom Stop-Kodon des kodogenen Genabschnitts angeordnet ist. Die Amplifikate werden elektrophoretisch aufgetrennt und hinsichtlich Quantität und Qualität bewertet. Wird ein Fragment in der entsprechenden Größe detektiert, erfolgt eine positive Bewertung. Die gegebenenfalls überprüften Plasmidkonstrukte werden anschließend für die Transformation der Pflanzen verwendet. Hierfür kann es zunächst erforderlich sein, die Konstrukte aus dem Zwischenwirt zu gewinnen. Beispielsweise lassen sich die Konstrukte als Plasmide aus bakteriellen Wirten in Anlehnung an eine herkömmliche Plasmidisolierung gewinnen. Es sind zahlreiche Verfahren zur Transformation von Pflanzen bekannt. Da erfindungsgemäß eine stabile Integration heterologer DNA in das Genom von Pflanzen von Vorteil ist, hat sich insbesondere die T-DNA-vermittelte Transformation als zweckmäßig erwiesen. Hierzu ist es zunächst erforderlich, geeignete Vehikel, insbesondere Agrobakterien, mit dem kodogenen Genabschnitt bzw. dem entsprechenden Plasmidkonstrukt zu transformieren. Dies kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Beispielsweise kann man das obigen Ausführungen entsprechend erzeugte Plasmidkonstrukt mittels Elektroporation oder Hitzeschock in kompetente Agrobakterien transformieren. Prinzipiell ist hierbei zwischen der Bildung co-integrierter Vektoren einerseits und der Transformation mit

binären Vektoren zu unterscheiden. Bei der ersten Alternative weisen die den kodogenen Genschnitt umfassenden Vektorkonstrukte keine T-DNA-Sequenzen auf, sondern die Bildung der co-integrierten Vektoren erfolgt in den Agrobakterien durch homologe Rekombination des Vektorkonstruktes mit T-DNA. Die T-DNA liegt in den Agrobakterien in Form von Ti- oder Ri-Plasmiden, in denen die Onkogene zweckmäßigerweise durch exogene DNA ersetzt wurden, vor. Verwendet man binäre Vektoren, so können diese durch bakterielle Konjugation oder direkten Transfer auf Agrobakterien übertragen werden. Diese Agrobakterien enthalten zweckmäßigerweise bereits den Vektor, der die vir-Gene trägt (häufig als Helfer-Ti(Ri)-Plasmid bezeichnet). Zusammen mit dem Plasmidkonstrukt und der T-DNA können zweckmäßigerweise auch ein oder mehrere Marker verwendet werden, anhand derer die Selektion transformierter Agrobakterien und transformierter Pflanzenzellen möglich ist. Für diesen Zweck wurde eine Vielzahl von Markern entwickelt. Hierzu gehören beispielsweise solche, die eine Resistenz gegen Chloramphenicol, Kanamycin, dem Aminoglykosid G418, Hygromycin und ähnliches verleihen. In der Regel ist es erwünscht, dass die Plasmidkonstrukte an einer oder beiden Seiten des kodogenen Genabschnitts durch T-DNA flankiert sind. Dies ist insbesondere dann von Nutzen, wenn Bakterien der Arten *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* für die Transformation verwendet werden. Eine erfindungsgemäß bevorzugte Methode ist die Transformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*. Aber auch biolistische Methoden können vorteilhaft zum Einbringen der Sequenzen im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, auch das Einbringen mittels PEG ist möglich. Die transformierten Agrobakterien können in an sich bekannter Weise kultiviert werden und stehen damit für eine zweckmäßige Transformation der Pflanzen bereit. Die zu transformierenden Pflanzen oder Pflanzenteile werden in herkömmlicher Weise angezogen bzw. bereitgestellt. Anschließend lässt man die transformierten Agrobakterien so lange auf die Pflanzen bzw. Pflanzenteile einwirken, bis eine hinreichende Transformationsrate erreicht ist. Das Einwirken der Agrobakterien auf die Pflanzen bzw. Pflanzenteile kann in unterschiedlicher Art und Weise erfolgen. Beispielsweise kann man eine Kultur morphogener pflanzlicher Zellen oder Gewebe verwenden. Im Anschluss an den T-DNA-Transfer werden die Bakterien in der Regel durch Antibiotika eliminiert und die Regeneration pflanzlichen Gewebes induziert. Insbesondere verwendet man hierzu geeignete pflanzliche Hormone, um nach anfänglicher Kallus-Bildung die Sprossentwicklung zu fördern. Eine vorteilhafte Transformationsmethode ist die Transformation in planta. Hierzu kann man beispielsweise die Agrobakterien auf pflanzliche Samen einwirken lassen oder Pflanzenmeristem mit Agrobakterien inokulieren. Erfindungsgemäß hat es sich insbesondere als zweckmäßig erwiesen, eine Suspension transformierter Agrobakterien auf die gesamte Pflanze oder zumindest die Blütenanlagen einwirken zu lassen. Diese wird anschließend weiter angezogen, bis Samen der behandelten Pflanze gewonnen werden (Clough und Bent, Plant J. (1998) 16, 735-743). Zur Auswahl transformierter Pflanzen wird das aus der Transformation gewonnene pflanzliche Material in der Regel selektiven Bedingungen unterworfen, so dass transformierte von nichttransformierten Pflanzen unterschieden werden können. Beispielsweise

25

den werden können. Beispielsweise können die in der vorstehend beschriebenen Art und Weise gewonnenen Samen erneut ausgebracht und nach Anzucht einer geeigneten Sprühselektion unterworfen werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Samen, erforderlichenfalls nach Sterilisation, auf Agarplatten unter Verwendung eines geeigneten Selektionsagens so anzuziehen, dass lediglich die transformierten Samen zu Pflanzen anwachsen können. Weitere vorteilhafte Transformationsmethoden insbesondere von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt und werden im folgenden beschrieben.

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die für im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Threonin-Aldolase codierenden Nukleinsäuresequenzen mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus (= transgener Organismus z.B. Pflanze oder Mikroorganismus) bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Die Expressionskassette (= Expressionskonstrukt = Genkonstrukt = Nukleinsäurekonstrukt) kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die Nukleinsäuresequenz(en), die für die Threonin-Aldolase-Proteine codiert(en), kann (können) in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der Expressionskassette vor. Dieses Nukleinsäurekonstrukt oder die Nukleinsäurekonstrukte können zusammen im Wirtsorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Nukleinsäurekonstrukt oder die Nukleinsäurekonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein, vorteilhaft. Im Falle von Pflanzen kann eine Integration ins Plastidengenom oder be-

vorzugt in das Zellgenom erfolgt sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.

5 Regulatorische Sequenzen sind in der Regel stromaufwärts (5'), innerhalb und/oder stromabwärts (3') in Bezug auf eine bestimmte Nukleinsäure bzw. einen bestimmten kodogenen Genabschnitts angeordnet. Sie kontrollieren insbesondere die Transkription und/oder Translation sowie die Transkriptstabilität des kodogenen Genabschnitts, gegebenenfalls in Zusammenspiel mit weiteren zelleigenen funktionellen Systemen wie dem Proteinbiosynthese-Apparat der Zelle.

10 Zu regulatorischen Sequenzen gehören vor allem stromaufwärts (5') angeordnete Sequenzen, welche insbesondere die Regulation der Transkriptionsinitiation betreffen, wie Promotoren, und stromabwärts (3') angeordnete Sequenzen, welche vor allem die Regulation der Transkriptionstermination betreffen, wie Polyadenylierungssignale.

Grundsätzlich sind alle Promotoren einsetzbar, welche die Transkription von Genen in Organismen wie Mikroorganismen, Pflanzen oder Nicht-humanen Tieren stimulieren können. Geeignete in diesen Organismen funktionsfähige Promotoren sind allgemein bekannt. Es kann sich um
15 konstitutive oder induzierbare Promotoren handeln. Geeignete Promotoren können in mehrzelligen Eukaryonten eine entwicklungs- und/oder gewebespezifisch Expression ermöglichen, so können in Pflanzen vorteilhaft Blatt-, Wurzel-, Blüten-, Samen-, Schließzellen- oder Frucht-spezifische Promotoren verwendet werden.

20 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem z.B. Translationsenhancersequenzen eingeführt werden oder die Stabilität der mRNA verbessert wird.

25 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, die eine oder mehrere Nukleinsäuresequenzen enthalten, die durch SEQ ID NO: 1 definiert sind und für die in SEQ ID NO: 2 wiedergegebenen Polypeptide kodieren. Eine weitere vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, die eine oder mehrere Nukleinsäuresequenzen enthalten, die sich von den erfindungsgemäßen Sequenzen SEQ
30 ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 ableiten lassen. Die genannten Polypeptide haben vorteilhaft eine Threonin-Aldolase- Aktivität. Gleiches gilt für ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der
35 Genexpression, verbunden sind.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem *cos*-, *tac*-, *rha*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacI^q*-T7-, T5-, T3-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, SP6-, λ -P_R- oder λ -P_L-Promotor, die vorteilhafterweise in Gram-negativen Bakterien verwendet werden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den

5 Gram-positiven Promotoren *amy*, *dnaK*, *xylS* und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF α , AC, P-60, UASH, MCB, PHO, CYC1, GAPDH, TEF, *rp28*, *ADH* oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294, US 5,352,605], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, PGEL1, OCS [Leisner and Gelvin (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85(5):2553-2557], *lib4*, *usp*, *mas* [Comai et al. (1990) Plant Mol Biol 15 (3):373-381],

10 STLS1, ScBV Schenk et al. (1999) Plant Mol Biol 39(6):1221-1230, B33, SAD1 oder SAD2 (Flachspromotoren, Jain et al., Crop Science, 39 (6), 1999: 1696 - 1701) oder *nos* [Shaw et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12(20):7831-7846]. Auch die verschiedenen Ubiquitinpromotoren aus Arabidopsis [Callis et al. (1990) J. Biol. Chem., 265:12486- 12493; Holtorf S et al. (1995) Plant. Mol. Biol., 29:637-747], Pinus, Mais [(Ubi1 und Ubi2), US 5,510,474; US 6,020,190 und US

15 6,054,574] oder Petersilie [Kawalleck et al., Plant Molecular Biology, 21, 1993: 673 - 684] oder Phaseolin-Promotor können vorteilhaft verwandt werden. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatz et al., Tetracyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzissinsäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) be-

20 schriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus Glycine max (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in spezifischen

25 Geweben ermöglichen oder eine präferenzielle Expression in bestimmten Geweben zeigen. Vorteilhaft sind auch samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße USP Promotor aber auch andere Promotoren wie der LeB4-, DC3-, SAD1-, Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-

30 Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus Arabidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), von Baumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233-239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen *lpt*-2- oder *lpt*-1-Promotor aus Gerste (WO

35 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste, der Ubiquitin-Promotor aus Mais und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft,

zusätzlich oder alleine synthetische Promotoren zu verwenden, besonders wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, wie z.B. beschrieben in WO 99/16890.

Um einen besonders effektiven Gehalt an Threonin-Aldolase-Proteinen in transgenen Pflanzen zu erzielen, können die codierten Biosynthesegene vorteilhaft konstitutiv und/oder samen-, frucht- oder knollenspezifisch in Pflanzen exprimiert werden. In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können sie aber auch induzierbar exprimiert werden, so dass sie gezielt in einer gewünschten Wachstumsphase der Pflanze induziert und damit exprimiert werden. Hierzu können Samen-spezifische Promotoren verwendet werden, bzw. solche Promotoren die im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind. Samen-spezifische Promotoren können prinzipiell sowohl aus dikotyledonen als auch aus monokotyledonen Pflanzen isoliert werden. Im folgenden sind vorteilhafte bevorzugte Promotoren aufgeführt: USP (= unknown seed protein) und Vicilin (Vicia faba) [Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet., 1991, 225(3)], Napin (Raps) [US 5,608,152], A-cyl-Carrier Protein (Raps) [US 5,315,001 und WO 92/18634], Oleosin (Arabidopsis thaliana) [WO 98/45461 und WO 93/20216], Phaseolin (Phaseolus vulgaris) [US 5,504,200], Bce4 [WO 91/13980], Leguminosen B4 (LegB4-Promotor) [Bäumlein et al., Plant J., 2,2, 1992], Lpt2 und lpt1 (Gerste) [WO 95/15389 u. WO 95/23230], Samen-spezifische Promotoren aus Reis, Mais u. Weizen [WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 und Aleurain [US 5,677,474], Bce4 (Raps) [US 5,530,149], Glycinin (Soja) [EP 571 741], Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase (Soja) [JP 06/62870], ADR12-2 (Soja) [WO 98/08962], Isocitratlyase (Raps) [US 5,689,040] oder β -Amylase (Gerste) [EP 781 849].

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Auch eine Expression spezifisch in Gymnospermen oder Angiospermen ist prinzipiell möglich

Um eine stabile Integration im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen in die transgene Pflanze über mehrere Generation sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die Aldolasen codieren, unter der Kontrolle eines eigenen bevorzugt eines unterschiedlichen Promotors exprimiert werden, da sich wiederholende Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationsereignissen bzw zu Silencing führen können. Die Expressionskassette ist dabei vorteilhaft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle zur Insertion der zu exprimierenden Nukleinsäure folgt vorteilhaft in einem Polylinker anschließend gegebenenfalls

ein Terminator hinter dem Polylinker liegt. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach bevorzugt drei-, vier- oder fünfmal, so dass bis zu fünf Gene in einem Konstrukt zusammengeführt werden und so zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu dreimal. Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über die geeignete Schnittstelle beispielsweise im Polylinker hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihren eigenen Terminator. Es ist aber auch möglich mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem Promotor und ggf. vor einem Terminator zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle bzw. die Abfolge der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, das heißt eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette inseriert sein, ohne dass dadurch die Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Promotoren wie beispielsweise der USP-, der LegB4-, der DC3-Promotor oder der Ubiquitin-Promotor aus *Petersilie* und unterschiedliche Terminatoren verwendet werden. Es ist aber auch möglich nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden. Dies kann jedoch zu unerwünschten Rekombinationsereignissen oder Silencingeffekten führen. Eine weitere vorteilhafte Nukleinsäuresequenz, die in Kombination mit den im Verfahren verwendeten Sequenzen und/oder den vorgenannten Biosynthesegenen exprimiert werden kann, ist die Sequenz für einen ATP/ADP-Translokator wie sie in WO 01/20009 beschrieben wird. Dieser ATP/ADP-Translokator führt zu einer Steigerung der Synthese der essentiellen Aminosäuren Lysin und/oder Methionin.

Wie oben beschrieben sollte die Transkription der eingebrachten Gene vorteilhaft durch geeignete Terminatoren am 3'-Ende der eingebrachten Biosynthesegene (hinter dem Stopcodon) abgebrochen werden. Verwendet werden kann hier z.B. der OCS1 Terminator. Wie auch für die Promotoren, so sollten hier für jedes Gen unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden.

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegene Gene des Aminosäurestoffwechsels, der Glykolyse, des Tricarbonsäurestoffwechsels oder deren Kombinationen verwendet.

Dabei können die vorgenannten Polypeptide bzw. Enzyme in Kombination mit weiteren Genen in den Nukleinsäurekonstrukten oder Vektoren kloniert werden und zur Transformation von Mikroorganismen oder Pflanzen mithilfe von z.B. Agrobacterium eingesetzt werden.

- 5 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert oder eine Translationsenhancersequenz eingefügt wird. Die Expressionskassetten können prinzipiell direkt zum Einbringen in die Pflanze verwendet werden oder aber in einen Vektoren eingebracht werden.
- 10

- Diese vorteilhaften Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, enthalten die im Verfahren verwendeten Nukleinsäure, die für Threonin-Aldolase-Proteine codieren, oder ein Nukleinsäurekonstrukt, die die verwendeten Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Genen wie den Biosynthesegenen des Aminosäurestoffwechsels enthält. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", welches für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung). Andere bevorzugte Vektoren werden vorteilhaft beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Sie können, wie vorgenannt, autonom replizieren oder in das Wirtsgenom integriert sein. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren, die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, TMV, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.
- 15
- 20
- 25
- 30

- Die im Verfahren vorteilhaft verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren umfassen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der verwendeten Nukleinsäuren in einer Wirtszelle eignen, was
- 35

- bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw., abhängen kann.
- Die verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren können speziell zur Expression von im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen ausgestaltet sein. Dies ist vorteilhaft, da häufig Zwischenschritte der Vektorkonstruktion der Einfachheit halber in Mikroorganismen durchgeführt werden. Beispielsweise können die Aminosäure- und/oder Threonin-Aldolase-Gene in bakteriellen Zellen, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen [siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F., et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge], Algen [Falcatore et al., 1999, Marine Biotechnology, 1, 3:239-251] mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie bevorzugt in Zellen vielzelliger Pflanzen [siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev.

Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literatursteilen)] expri-
miert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, Gene Expression Tech-
nology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Die Sequenz des
rekombinanten Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-
5 Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert wer-
den.

Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder
induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-
Fusionsproteinen steuern. Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a. pGEX (Pharmacia
10 Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Bio-
labs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase
(GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert
wird.

Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc
15 (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d [Studier et al., Gene Expression Technol-
ogy: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89]. Die
Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase
von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor
beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexpri-
20 mierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den
Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten ϕ -Prophagen bereitge-
stellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese
Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die
25 pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M113mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2,
pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 or pBdCl, in Streptomyces pIJ101,
pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium
pSA77 oder pAJ667.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Bei-
30 spiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYeDesaturasec1 (Bal-
dari et al. (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943),
pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San
Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in
anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend be-
35 schrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. [(1991) "Gene transfer systems and

33

vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge; oder in: More Gene Manipulations in Fungi; J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego].

Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise 2 α M, pAG-1, YEpl3 oder

5 pEMBLy23.

Als weitere Vektoren seien in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004 oder pDH51 beispielhaft genannt.

Alternativ können die Nukleinsäuresequenzen in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von
10 Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in:
15 Cloning Vectors (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

20 Bei einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens können die Nukleinsäuresequenzen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. [(1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197] und Bevan, M.W. [(1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38]. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung findet sich auch in Hellens, R., Mullineaux, P. und Klee H. , [(2000) "A guide to *Agrobacterium* binary vectors", Trends in Plant Science, Vol 5 No.10, 446-451.
30

Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise
35 Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus Agro-

34

bacterium tumefaciens-T-DNA stammen, wie das als Octopinsynthese bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

- 5 Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbundene Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

- 10 Zur Expression in Pflanzen müssen die Nukleinsäuresequenzen wie oben beschrieben funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Nutzbare Promotoren sind konstitutive Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913), 34S FMV (Sanger et al., Plant. Mol. Biol., 14, 1990: 433 - 443), der
15 Ubiquitin-Promotor aus Petersilie oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

- Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, Crit.
20 Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

- Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn
25 gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer
30 Promotor.

- Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alphaamylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder
35 der durch Verwundung induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

35

Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Aminosäure-Biosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus *Vicia faba* (Bäumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus *Brassica* (WO 91/13980), der *arc5*-Promotor aus der Bohne, der DcG3-Promotor aus der Karotte oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Bäumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Vorteilhafte samenspezifische Promotoren sind der Sucrose-Binding-Protein-Promotor (WO 00/26388), der Phaseolin-Promotor und der Napin-Promotor. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der *lpt2*- oder *lpt1*-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren allein oder in Kombination mit anderen Genen bzw. Nukleinsäuren gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der *clpP*-Promotor aus *Arabidopsis*, beschrieben in WO 99/46394.

Für die starke Expression heterologer Sequenzen in möglichst vielen Geweben, insbesondere auch Blättern, werden neben verschiedenen der oben genannten viralen und bakteriellen Promotoren, bevorzugt pflanzliche Promotoren von Actin- oder Ubiquitin-Genen, wie beispielsweise der Actin1-Promotor aus Reis verwendet. Ein weiteres Beispiel für konstitutive pflanzliche Promotoren stellen die V-ATPase-Promotoren aus Zuckerrübe dar (WO 01/14572). Beispielhaft für synthetische konstitutive Promotoren sind der Super-Promotor (WO 95/14098) und von G-Boxen abgeleitete Promotoren (WO 94/12015) zu nennen. Weiterhin können unter Umständen auch chemisch induzierbare Promotoren genutzt werden, vergleiche EP-A 388186, EP-A 335528, WO 97/06268. Auch stehen für die Expression von Genen in Pflanzen blattspezifische

Promotoren wie in DE-A 19644478 beschrieben, oder lichtregulierte Promotoren, wie beispielsweise der petE-Promotor aus Erbse zur Verfügung.

Von den Polyadenylierungssignalen ist insbesondere die Poly-A-Additionssequenz aus dem ocs-Gen oder nos-Gen von *Agrobacterium tumefaciens* zu nennen. Zu weiteren gegebenenfalls zweckmäßigen regulatorischen Sequenzen gehören auch Sequenzen, die den Transport und/oder die Lokalisierung der Expressionsprodukte steuern (Targeting). Hier sind insbesondere die an sich bekannten Signalpeptid oder Transitpeptid kodierenden Sequenzen zu nennen. Beispielsweise gelingt es mit Hilfe von Plastid-Transitpeptid kodierenden Sequenzen, das Expressionsprodukt in die Plastide einer Pflanzenzelle zu leiten. Als Empfängerpflanzen werden wie oben beschrieben insbesondere Pflanzen bevorzugt, die in zweckmäßiger Weise transformiert werden können. Hierzu gehören mono- und dikotyledone Pflanzen. Insbesondere sind landwirtschaftliche Nutzpflanzen wie Getreide und Gräser, z.B. *Triticum* spp., *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, Hafer, *Secale cereale*, *Oryza sativa*, *Pennisetum glaucum*, *Sorghum bicolor*, *Triticale*, *Agrostis* spp., *Cenchrus ciliaris*, *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, *Lolium* spp., *Medicago* spp. und *Saccharum* spp., Hülsenfrüchte und Ölfrüchte, z.B. *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Glycine max*, *Arachis hypogaea*, *Gossypium hirsutum*, *Cicer arietinum*, *Helianthus annuus*, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Sinapis alba*, *Trifolium repens* und *Vicia narbonensis*, Gemüse und Früchte, z.B. Bananen, Weintrauben, *Lycopersicon esculentum*, Spargel, Kohl, Wassermelonen, Kiwis, *Solanum tuberosum*, *Beta vulgaris*, Cassava und Chicory, Bäume, z.B. *Coffea* species, *Citrus* spp., *Eucalyptus* spp., *Picea* spp., *Pinus* spp. und *Populus* spp., medizinische Pflanzen und Bäume sowie Blumen zu nennen. Gemäß einer besonderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzen der Gattung *Arabidopsis*, z.B. *Arabidopsis thaliana* und der Gattung *Oryza*.

Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Coprazipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, PEG-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, *Agrobacterium* protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

37

Der Begriff "Nukleinsäure(molekül bzw. -sequenz)", wie hier verwendet, kann zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs mit umfassen. Vorteilhaft wird zur Klonierung und Expression nur der codierende Bereich genommen. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Nukleinsäuremolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt flankieren.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Diese können als Hybridisierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) zur Isolierung weiterer im Verfahren nützlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St.Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1 oder mithilfe der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen erstellen.. Weiterhin können durch Proteinsequenzvergleiche von Threonin-Aldolasen aus verschiedenen Organismen konservierte Bereiche identifiziert werden, von denen

dann wiederum degenerierte Primer abgeleitet werden können. Diese degenerierten Primer können dann mittels PCR zur Amplifikation von Fragmenten neuer Threonin-Aldolasen aus weiteren Organismen genutzt werden. Diese Fragmente können dann als Hybridisierungs-sonde für die Isolierung der vollständigen Gensequenz genutzt werden. Alternative können die fehlenden 5' und 3'-Sequenzen mittels RACE-PCR isoliert werden. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer der im Verfahren verwendeten Nukleotidsequenzen entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafte Nukleinsäuremoleküle können auf der Grundlage ihrer Homologie zu den hier offenbarten Nukleinsäuren unter Verwendung der Sequenzen oder eines Teils davon als Hybridisierungs-sonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Dabei können beispielsweise isolierte Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die mindestens 15 Nukleotide lang sind und unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekülen, die eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 umfassen, hybridisieren. Es können auch Nukleinsäuren mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide verwendet werden. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Unter Homolog oder Homologie ist im Sinne der Erfindung identisch oder Identität zu verstehen. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im obengenannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC

und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden Lehrbüchern Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie (= Identität) von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10) oder von zwei Nukleinsäuren (z.B. der Sequenz SEQ ID NO: 1) werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen.

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für eine Threonin-Aldoase kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO: 2 oder den Sequenzen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 oder in die den von den vorgenannten Aminosäuresequenzen abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 1 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konservativen

Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer Proteinsequenz wie SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können auf ihre biologische Aktivität das heißt die Aminosäureproduktion hin durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die die biologische Aktivität beibehalten bzw. erhöht haben. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 1 oder der von den vorgenannten Sequenzen ableitbaren Nukleinsäuresequenz kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier beschriebenen Tests bestimmt werden.

Homologe der verwendeten Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder der von den Sequenzen SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen bedeuten beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 30 bis 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 50 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleotidsequenzen oder den vorgenannten abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Weiterhin sind isolierte Nukleinsäuremoleküle einer Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleotidsequenzen, den abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen oder einen Teil davon hybridisieren, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz oder den abgeleiteten Nukleinsäuresequenzen erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität bzw. die biologische Aktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die wesentliche enzymatische Aktivität der Threonin-Aldolase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, 25

besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen biologischen bzw. Enzym-Aktivität, vorteilhaft verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 2 kodierten Protein.

Homologen der SEQ ID NO: 1 oder der abgeleiteten Sequenzen bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA
5 der kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenz.

Unter Homologen der SEQ ID NO: 1 oder der abgeleiteten Sequenzen sind auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten, zu verstehen. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren
10 durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

Die vorgenannten Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit Aldolase-Aktivität, die am Stoffwechsel von Aminosäuren beteiligt sind, werden zur Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen verwendet.
15

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 °C und 100 °C, bevorzugt zwischen 10 °C bis 60 °C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann batch wise, semi batch wise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden. Die hergestellten Aminosäuren können nach dem Fachmann bekannten Verfahren aus den Organismen isoliert werden. Beispielsweise über Extraktion, Salzfällung und/oder Ionenaustauschchromatographie. Die Organismen können dazu vorher noch aufgeschlossen werden.
20
25
30

Das erfindungsgemäße Verfahren wird, wenn es sich bei den Wirtsorganismen um Mikroorganismen handelt, vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0 °C bis 95 °C, bevorzugt zwischen 10 °C bis 85 °C, besonders bevorzugt zwischen 15 °C bis 75 °C, ganz besonders bevorzugt zwischen 15 °C bis 45 °C durchgeführt

42

Der pH-Wert wird dabei vorteilhaft zwischen pH 4 und 12, bevorzugt zwischen pH 6 und 9, besonders bevorzugt zwischen pH 7 und 8 gehalten.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren kann batchweise, semi-batchweise oder kontinuierlich betrieben werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

- 10 Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen wie oben beschrieben gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

- 15 Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und/oder Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und/oder Linolsäure, Alkohole und/oder Polyalkohole wie z. B. Glycerin, Methanol und/oder Ethanol und/oder organische Säuren wie z. B. Essigsäure und/oder Milchsäure.

- 25 Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak in flüssiger- oder gasform oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

30 Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

43

Als Schwefelquelle für die Herstellung von schwefelhaltigen Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

- 5 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikalliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

- 10 Die erfindungsgemäß zur Kultivierung von Mikroorganismen eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothemat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.
- 15
- 20

Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

- 25 Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht lässt sich während der Anzucht durch Zugabe von basischen Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder sauren Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die Kultur einge-
- 30
- 35

tragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

- 5 Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin und/oder L-Lysin enthaltenden, Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf \geq

- 10 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Die Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.

- 15 Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.

- 20 Es ist aber auch möglich die Aminosäure weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produktthaltige Brühe nach dem Abtrennen der Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

- 25
- 30 Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefasst in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotechnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's En-

- 5 cyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

Die im Verfahren gewonnenen Aminosäuren eignen sich als Ausgangsmaterial für die Synthese von weiteren Wertprodukten. Sie können beispielsweise in Kombination miteinander oder allein zur Herstellung von Pharmaka, Nahrungsmittel, Tierfutter oder Kosmetika verwendet werden.

- 10 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird wie oben beschrieben als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone –
- 15 die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant
- 20 Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung
- 25 gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen mit Agrobacterium tumefaciens wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 beschrieben oder ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.
- 30 Für die Selektion einer erfolgreichen Einbringung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in einen Wirtsorganismus werden vorteilhaft Markergene verwendet. Diese Markergene ermöglichen die Identifizierung einer erfolgreichen Einbringung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren über eine Reihe verschiedener Prinzipien beispielsweise über eine visuelle Erkennung mit Hilfe von Fluoreszenz, Lumineszenz oder im für den Mensch sichtbaren Wellenbereich des Lichtes, über
- 35 eine Herbizid- oder Antibiotikaresistenz, über sogenannte nutritive (Auxotrophiemarker) oder anti-nutritive Marker, über Enzymassays oder über Phytohormone. Als Beispiele für derartige

Marker seien hier das GFP (= Green fluorescent Protein); das Luciferin/Luciferasesystem; die β -Galactosidase mit ihren farbigen Substraten z.B. X-Gal; die Herbizidresistenzen gegen z.B. Imidazolinon, Glyphosat, Phosphothricin oder Sulfonylharnstoff; die Antibiotikaresistenzen gegen z.B. Bleomycin, Hygromycin, Streptomycin, Kanamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Ampicillin, Gentamycin, Geneticin (G418), Spectinomycin oder Blastidicin um nur einige zu nennen; nutritive Marker wie die Mannose- oder Xyloseverwertung oder anti-nutritive Marker wie 2-Deoxyglukoseresistenz genannt. Diese Liste gibt einen kleinen Ausschnitt möglicher Marker wieder. Dem Fachmann sind derartige Marker wohl bekannt. Je nach Organismus und Selektionsmethode sind unterschiedliche Marker bevorzugt.

- 10 Über die stabile oder transiente Integration von Nukleinsäuren in Pflanzenzellen ist bekannt, dass je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA aufnimmt und falls gewünscht in ihr Genom integriert. Zur Identifikation und Selektion dieser Integranten wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektierbaren Marker (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) kodiert, zusammen mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker umfassen in Pflanzen solche, welche Resistenz gegen ein Herbizid, wie Glyphosphat oder Glufosinat, verleihen. Weitere geeignete Marker sind beispielsweise Marker, welche Gene kodieren, die an Biosynthesewegen von zum Beispiel Zuckern oder Aminosäuren beteiligt sind, wie β -Galactosidase, *ura3* oder *ilv2*. Marker, welche Gene, wie Luziferase, *gfp* oder andere Fluoreszenzgene kodieren, sind ebenfalls geeignet. Diese Marker lassen sich in Mutanten verwenden, in denen diese Gene nicht funktionell sind, da sie beispielsweise mittels herkömmlicher Verfahren deletiert worden sind. Ferner können Marker, welche eine Nukleinsäure kodieren, die einen selektierbaren Marker kodiert, in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige, der für die im Verfahren verwendeten Threonin-Aldolasen kodiert, oder können auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können zum Beispiel durch Selektion identifiziert werden (z.B. überleben Zellen, die den selektierbaren Marker integriert haben, wohingegen die anderen Zellen absterben).

- Da die Markergene in der Regel speziell die Antibiotika- und Herbizidresistenzen in der transformierten Wirtszelle nach erfolgreicher Einbringung der Nukleinsäuren nicht mehr benötigt werden bzw. unerwünscht sind, werden im erfindungsgemäßen Verfahren zur Einbringung der Nukleinsäuren vorteilhaft Techniken verwendet, die eine Entfernung bzw. Exzision dieser Markergene ermöglicht. Eine derartige Methode ist die sogenannte Co-Transformation. Bei der Co-Transformation werden zur Transformation zwei Vektoren gleichzeitig verwendet, wobei ein Vektor die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und ein zweiter das oder die Markergene trägt. Ein hoher Teil der Transformanten erhält bzw. enthält bei Pflanzen (bis zu 40 % der Transformanten und mehr) beide Vektoren. Durch Kreuzung lassen sich anschließend die Markergene aus der transformierten Pflanze entfernen. Eine weitere Methode verwendet Markergene, die in

ein Transposon integriert wurden, zur Transformation zusammen mit den gewünschten Nukleinsäuren (sog. Ac/Ds-Technologie). In einigen Fällen (ca. 10 %) springt das Transposon nach erfolgreicher Transformation aus dem Genom der Wirtszelle und geht verloren. In eine weiteren Anzahl von Fällen springt das Transposon an eine andere Stelle. In diesen Fällen muss das Markergen wieder ausgekreuzt werden. In der Mikrobiologie wurden Techniken entwickelt, die eine Detektion derartiger Ereignisse ermöglicht bzw. erleichtert. Eine weitere vorteilhafte Methode verwendet sogenannte Rekombinationssysteme, die den Vorteil haben, dass auf eine Auskreuzung verzichtet werden kann. Das bekannteste derartige System ist das sogenannte Cre/lox-System. Cre1 ist eine Rekombinase, die die Sequenzen, die zwischen der loxP-Sequenz liegen, entfernt. Wird das Markergen zwischen die loxP-Sequenz integriert, so wird es nach erfolgreicher Transformation durch Expression der Rekombinase entfernt. Weitere Rekombinationssysteme sind das HIN/HIX-, das FLP/FRT- und das REP/STB-System (Tribble et al., J.Biol. Chem., 275, 2000: 22255 - 22267; Velmurugan et al., J. Cell Biol., 149, 2000: 553 - 566). Auch eine gezielte Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen in das Pflanzengenom ist prinzipiell möglich, aber aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes weniger bevorzugt. Diese Methoden sind natürlich auch bei Mikroorganismen wie Hefen, Pilze oder Bakterien anwendbar.

Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie beispielsweise Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Neben der Transformation von somatischen Zellen, welche dann zu Pflanzen regeneriert werden müssen, können auch Zellen pflanzlicher Meristeme und insbesondere solche Zellen, die sich zu Gameten entwickeln, transformiert werden. In diesem Fall führen die transformierten Gameten auf dem Weg der natürlichen Pflanzenentwicklung zu transgenen Pflanzen. So werden beispielsweise Samen von Arabidopsis mit Agrobakterien behandelt und von den sich daraus entwickelnden Pflanzen Samen gewonnen, die dann zu einer bestimmten Rate transformiert, daher transgen sind (Feldman, KA und Marks MD (1987), *Agrobacterium*-mediated trans-

formation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non tissue culture approach. Mol Gen Genet 208:274-289; Feldmann K (1992) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: seed infection transformation. In C Koncz, N-H Chua und J Shell, eds, Methods in *Arabidopsis* Research. Word Scientific, Singapore, pp274-289). Alternative Methoden beruhen auf der wiederholten Entfernung der Infloreszenzen und der Inkubation der Schnittstelle im Zentrum der Rosette mit transformierten Agrobakterien, wodurch ebenfalls später transformierte Samen gewonnen werden können (Chang, SS, Park SK, Kim, BC, Kang, BJ, Kim DU und Nam, HG (1994) Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation *in planta*. Plant J. 5: 551-558; Katavic, V, Haughn, GW, Reed, D, Martin, M und Kunst, L (1994) *In planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet, 245: 363-370). Besonders effizient ist jedoch die Methode der Vakuum-Infiltration mit ihren Abwandlungen wie "Floral dip". Bei der Vakuuminfiltration von *Arabidopsis* werden ganze Pflanzen unter Vakuum mit einer Agrobakteriumsuspension behandelt (Bechthold, N, Ellis, J, und Pelletier, G (1993) *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C R Acad Sci Paris Life Sci, 316: 1194-1199), während bei der "Floral dip"-Methode das sich entwickelnde Blütengewebe in einer mit einem Surfactant versetzten Agrobakteriumsuspension kurzzeitig inkubiert wird (Clough, SJ und Bent, AF (1998) Floral dip: a simple method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant J. 16, 735-743). In beiden Fällen werden zu einem bestimmten Prozentsatz transgene Samen geerntet, die durch Anzucht unter den bereits beschriebenen selektiven Bedingungen von nicht transgenen Samen unterschieden werden können.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft deshalb transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Die Begriffe "Wirtsorganismus", "Wirtszelle", "rekombinanter (Wirts)organismus", "rekombinante (Wirts)zelle", "transgener (Wirts)organismus" und "transgene (Wirts)zelle" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Selbstverständlich betreffen diese Begriffe nicht nur den bestimmten Wirtsorganismus oder die bestimmte Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder potentiellen Nachkommen dieser Organismen bzw. Zellen. Da in aufeinanderfolgenden Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen bestimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch immer noch vom Umfang des Begriffs, wie hier verwendet, umfasst.

Ein anderer Aspekt der Erfindung sind die in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 10 genannten Aminosäuresequenzen.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

5 Beispiele:

Beispiel 1: Klonierung von SEQ ID NO: 1 in *Escherichia coli*

10 SEQ ID NO: 1 wurde gemäß bekannter und gut eingeführter Verfahren (siehe bspw. Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons) in die Plasmide pBR322 (Sutcliffe, J.G. (1979) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 75: 3737-3741); pA-CYC177 (Change & Cohen (1978) J. Bacteriol. 134: 1141-1156); Plasmide der pBS-Reihe (pBSSK+, pBSSK- und andere; Stratagene, LaJolla, USA) oder Cosmide, wie SuperCos1 (Stratagene, LaJolla, USA) oder Lorist6 (Gibson, T.J. Rosenthal, A., und Waterson, R.H. (1987) Gene 53: 283-286) zur Expression in *E. coli* kloniert.

15 Beispiel 2: DNA-Sequenzierung und Computer-Funktionsanalyse

Die DNA-Sequenzierung wurde gemäß Standard-Verfahren, insbesondere dem Kettenabbruchverfahren mit ABI377-Sequenziermaschinen (s. z.B. Fleischman, R.D. et al. (1995) "Whole-genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus Influenzae* Rd., Science 269: 496-512) durchgeführt.

20 Beispiel 3: In-vivo-Mutagenese

25 In vivo-Mutagenese von *Corynebacterium glutamicum* kann durchgeführt werden, indem eine Plasmid- (oder andere Vektor-) DNA durch *E. coli* oder andere Mikroorganismen (z.B. *Bacillus* spp. oder Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*) geleitet wird, die die Integrität ihrer genetischen Information nicht aufrechterhalten können. Übliche Mutatorstämme weisen Mutationen in den Genen für das DNA-Reparatursystem auf [z.B., mutHLS, mutD, mutT, usw., zum Vergleich siehe Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms in *Escherichia coli* and *Salmonella*, S. 2277-2294, ASM: Washington]. Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist bspw. in Greener, A. und Callahan, M. (1994) Strategies 7; 32-34 veranschaulicht.

Beispiel 4: DNA-Transfer zwischen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*

30 Mehrere *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten enthalten endogene Plasmide (wie bspw. pHM1519 oder pBL1) die autonom replizieren (für einen Überblick siehe bspw. Martin, J.F. et al. (1987) Biotechnology 5: 137-146). Shuttle-Vektoren für *Escherichia coli* und *Corynebacterium*

glutamicum lassen sich leicht mittels Standard-Vektoren für *E. coli* konstruieren (Sambrook, J. et al., (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons), denen ein Replikationsursprung für und ein geeigneter Marker aus *Corynebacterium glutamicum* beigegeben wird. Solche Replikationsursprünge werden vorzugsweise von endogenen Plasmiden entnommen, die aus *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten isoliert worden sind. Besondere Verwendung als Transformationsmarker für diese Arten sind Gene für Kanamycin-Resistenz (wie solche, die vom Tn5- oder Tn-903-Transposon stammen) oder für Chloramphenicol (Winnacker, E.L. (1987) "From Genes to Clones - Introduction to Gene Technology, VCH, Weinheim). Es gibt zahlreiche Beispiele in der Literatur zur Herstellung einer großen Vielzahl von Shuttle-Vektoren, die in *E. coli* und *C. glutamicum* repliziert werden, und die für verschiedene Zwecke verwendet werden können, einschließlich Gen-Überexpression (siehe bspw. Yoshida, M. et al. (1985) J. Bacteriol. 162: 591-597, Martin, J.F. et al., (1987) Biotechnology, 5: 137-146 und Eikmanns, B.J. et al. (1992) Gene 102: 93-98). Geeignete Vektoren, die in coryneformen Bakterien replizieren, sind beispielsweise pZ1 (Menkel et al., Appl. Environ. Microbiol., 64, 1989: 549 – 554) pEkEx1 (Eikmanns et al., Gene 102, 1991: 93 – 98) oder pHS2-1 (Sonnen et al, Gene 107, 1991: 69 – 74). Diese Vektoren beruhen auf den kritischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie zum Beispiel solche, die auf pCG4 (US 4,489,160), pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiol. Lett., 66, 1990: 119 – 124) oder pAG1 (US 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Mittels Standard-Verfahren ist es möglich, ein Gen von Interesse in einen der vorstehend beschriebenen Shuttle-Vektoren zu klonieren und solche Hybrid-Vektoren in *Corynebacterium glutamicum*-Stämme einzubringen. Die Transformation von *C. glutamicum* lässt sich durch Protoplastentransformation (Kastsumata, R. et al., (1984) J. Bacteriol. 159, 306-311), Elektroporation (Liebl, E. et al., (1989) FEMS Microbiol. Letters, 53: 399-303) und in Fällen, bei denen spezielle Vektoren verwendet werden, auch durch Konjugation erzielen (wie z.B. beschrieben in Schäfer, A., et (1990) J. Bacteriol. 172: 1663-1666). Es ist ebenfalls möglich, die Shuttle-Vektoren für *C. glutamicum* auf *E. coli* zu übertragen, indem Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* (mittels im Fachgebiet bekannter Standard-Verfahren) präpariert wird und in *E. coli* transformiert wird. Dieser Transformationsschritt kann mit Standard-Verfahren erfolgen, jedoch wird vorteilhafterweise ein Mcr-defizienter *E. coli*-Stamm verwendet, wie NM522 (Gough & Murray (1983) J. Mol. Biol. 166: 1-19).

Soll vorteilhafterweise die Integration der transformierten Sequenz(en) in das Genom der coryneformen Bakterien erfolgen, so sind auch hierfür dem Fachmann Standardtechniken bekannt. Hierfür werden beispielsweise Plasmidvektoren verwendet, wie sie von Remscheid et al. (Appl. Environ. Microbiol., 60, 1994: 126 – 132) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurden. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmid-

vektor kloniert, der in einem Wirt wie *E. coli*, nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 1983: 784 – 791), pKIBmob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 1994: 69 – 73), pGEM-T (Promega Corp., Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Schuman, J. Biol. Chem., 269, 1994: 32678 – 32684, US 5,487,993), pCR[®]Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande) oder pEM1 (Schrumpf et al., J. Bacteriol., 173, 1991: 4510 – 4516) in Frage.

Beispiel 5: Bestimmung der Expression des mutanten/transgenen Proteins

Die Beobachtungen der Aktivität eines mutierten bzw. transgenen Proteins in einer transformierten Wirtszelle beruhen auf der Tatsache, dass das Protein auf ähnliche Weise und in ähnlicher Menge exprimiert wird wie das Wildtyp-Protein. Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Transkriptionsmenge des mutanten bzw. transgenen Gens (ein Anzeichen für die mRNA-Menge, die für die Translation des Genprodukts verfügbar ist) ist die Durchführung eines Northern-Blots (s. bspw. Ausubel et al., (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York), wobei ein Primer, der so ausgestaltet ist, dass er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren (gewöhnlich radioaktiven oder chemilumineszierenden) Markierung versehen wird, so dass - wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix übertragen und mit dieser Sonde inkubiert wird - die Bindung und die Quantität der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge von mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information ist ein Nachweis für das Ausmaß der Transkription des Gens. Gesamt-Zell-RNA lässt sich durch verschiedene Verfahren aus *Corynebacterium glutamicum* isolieren, die im Fachgebiet bekannt sind, wie beschrieben in Bormann, E.R. et al., (1992) Mol. Microbiol. 6: 317-326.

Zur Bestimmung des Vorliegens oder der relativen Menge von Protein, das aus dieser mRNA translatiert wird, können Standard-Techniken, wie Western-Blot, eingesetzt werden (s. bspw. Ausubel et al. (1988) "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley, New York). Bei diesem Verfahren werden Gesamt-Zellproteine extrahiert, durch Gelelektrophorese getrennt, auf eine Matrix, wie Nitrocellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, inkubiert, die an das gewünschte Protein spezifisch bindet. Diese Sonde ist gewöhnlich direkt oder indirekt mit einer chemilumineszierenden oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die beobachtete Menge an Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gesuchten Mutantenproteins in der Zelle an.

Beispiel 6: Wachstum von genetisch verändertem *Corynebacterium glutamicum* - Medien und Anzuchtbedingungen

Genetisch veränderte *Corynebakterien* werden in synthetischen oder natürlichen Wachstumsmedien gezüchtet. Eine Anzahl unterschiedlicher Wachstumsmedien für *Corynebakterien* sind

bekannt und leicht erhältlich (Lieb et al. (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210; von der Osten et al. (1998) Biotechnology Letters 11: 11-16; Patent DE 4 120 867; Liebl (1992) "The Genus Corynebacterium", in: The Prokaryotes, Bd. II, Balows, A., et al., Hrsg. Springer-Verlag). Diese Medien bestehen aus einer oder mehreren Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganischen Salzen, Vitaminen und Spurenelementen. Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind bspw. Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte aus der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Alkohole und/oder organische Säuren, wie Methanol, Ethanol, Essigsäure oder Milchsäure. Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas, wässrige Ammoniaklösungen oder Ammoniumsalze, wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakte, Fleischextrakte und andere. Auch Mischungen der vorgenannten Stickstoffquellen können vorteilhaft verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor-, oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen. Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat oder organische Säuren, wie Citronensäure. Die Medien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen bspw. Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothensäure und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist beispielsweise erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

Sämtliche Medienkomponenten sind sterilisiert, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegeben sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

Die Anzuchtbedingungen werden für jedes Experiment gesondert definiert. Die Temperatur sollte zwischen 15°C und 45°C liegen und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen, und kann durch Zugabe von Puffern zu den Medien aufrechterhalten werden. Ein beispielhafter Puffer für diesen Zweck ist ein Kaliumphosphatpuffer. Synthetische Puffer, wie MOPS, HEPES; ACES usw., können alternativ oder gleichzeitig verwendet werden. Der Anzucht-pH-Wert lässt sich während der Anzucht auch durch Zugabe von z.B. NaOH oder NH₄OH konstant halten. Werden komplexe Medienkomponenten, wie Hefe-Extrakt verwendet, sinkt der Bedarf an zusätzlichen Puffern, da viele komplexe Verbindungen eine hohe Pufferkapazität aufweisen. Beim Einsatz eines Fermenters für die Anzucht von Mikroorganismen kann der pH-Wert auch mit gasförmigem Ammoniak reguliert werden.

Die Inkubationsdauer liegt gewöhnlich in einem Bereich von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen. Diese Zeit wird so ausgewählt, dass sich die maximale Menge Produkt in der Fermentationsbrühe ansammelt. Die offenbarten Wachstumsexperimente können in einer Vielzahl von Behältern, wie Mikrotiterplatten, Glasröhrchen, Glaskolben oder Glas- oder Metallfermentern unterschiedlicher Größen durchgeführt werden. Zum Screening einer großen Anzahl von Klonen sollten die Mikroorganismen in Mikrotiterplatten, Glasröhrchen oder Schüttelkolben entweder mit oder ohne Schikanen gezüchtet werden. Vorzugsweise werden 100-ml-Schüttelkolben verwendet, die mit 10% (bezogen auf das Volumen) des erforderlichen Wachstumsmediums gefüllt sind. Die Kolben sollten auf einem Kreiselerschüttler (Amplitude 25 mm) mit einer Geschwindigkeit im Bereich von 100-300 U/min geschüttelt werden. Verdampfungsverluste können durch Aufrechterhalten einer feuchten Atmosphäre verringert werden; alternativ sollte für die Verdampfungsverluste eine mathematische Korrektur durchgeführt werden.

Werden genetisch modifizierte Klone untersucht, sollten auch ein unmodifizierter Kontrollklon oder ein Kontrollklon getestet werden, der das Basisplasmid ohne Insertion enthält. Soll eine transgene Sequenz exprimiert werden, so sollte vorteilhafterweise auch in diesem Fall ein Kontrollklon mit getestet werden. Das Medium wird vorteilhaft auf eine OD₆₀₀ von 0,5 - 1,5 angeimpft, wobei Zellen verwendet werden, die auf Agarplatten gezüchtet wurden, wie CM-Platten (10 g/l Glucose, 2,5 g/l NaCl, 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Polypepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Fleischextrakt, 22 g/l Agar pH-Wert 6,8 mit 2 M NaOH), die bei 30°C inkubiert worden sind. Das Animpfen der Medien erfolgt entweder durch Einbringen einer Kochsalzlösung von *C. glutamicum*-Zellen von CM-Platten oder durch Zugabe einer flüssigen Vorkultur dieses Bakteriums.

Beispiel 7: In-vitro-Analyse der Funktion der durch die transformierten Sequenzen codierten Proteine

Die Bestimmung der Aktivitäten und kinetischen Parameter von Enzymen ist im Fachgebiet gut bekannt. Experimente zur Bestimmung der Aktivität eines bestimmten veränderten Enzyms müssen an die spezifische Aktivität des Wildtypenzyms angepasst werden, was innerhalb der Fähigkeiten des Fachmann liegt. Überblicke über Enzyme im Allgemeinen sowie spezifische

- 5 Einzelheiten, die die Struktur, Kinetiken, Prinzipien, Verfahren, Anwendungen und Beispiele zur Bestimmung vieler Enzymaktivitäten betreffen, können bspw. in den nachstehenden Literaturstellen gefunden werden: Dixon, M., und Webb, E.C. (1979) *Enzymes*, Longmans, London; Fersht (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York; Walsh (1979) *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman, San Francisco; Price, N.C., Stevens, L. (1982) *Fundamentals of Enzymology*. Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P.D. Hrsg. (1983) *The Enzymes*, 3. Aufl. Academic Press, New York; Bisswanger, H. (1994) *Enzymkinetik*, 2. Aufl. VCH, Weinheim (ISBN 3527300325); Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Graßl, M. Hrsg. (1983-1986) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3. Aufl. Bd. I-XII, Verlag Chemie: Weinheim; und Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1987) Bd. A9, "Enzymes", VCH, Weinheim, S. 352-363.

- 15 Beispiel 8: Analyse des Einflusses der Nukleinsäuren auf die Produktion der Aminosäuren

- Die Wirkung der genetischen Modifikation in *C. glutamicum* auf die Produktion einer Aminosäure kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen unter geeigneten Bedingungen (wie solchen, die vorstehend beschrieben sind) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion der Aminosäure untersucht wird. Solche Analysetechniken sind dem Fachmann wohlbekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (s. bspw. Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Bd. 17; Rehm et al. (1993) *Biotechnology*, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. et al. (1988) *Bioseparations: downstream processing for Biotechnology*, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. und Cabral, J.M.S. (1992) *Recovery processes for biological Materials*, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A. und Henry, J.D. (1988) *Biochemical Separations*, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) *Separation and purification techniques in biotechnology*, Noyes Publications).

- Zusätzlich zur Messung des Fermentationsendproduktes ist es ebenfalls möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamt-Produktivität des Organismus, die Ausbeute und/oder die Effizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen.

Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (bspw. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion gewöhnlicher Metabolite aus Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden.

- 5 Standardverfahren für diese Messungen sind in *Applied Microbial Physiology; A Practical Approach*, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsg. IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und den darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Beispiel 9: Reinigung der Aminosäure aus *C. glutamicum*-Kultur

- 10 Die Gewinnung der Aminosäure aus *C. glutamicum*-Zellen und/oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kultur kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Hierzu wird zunächst der Kulturüberstand gewonnen, dazu werden die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet, die Zellen können anschließend durch Standard-Techniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschall, zertrümmert bzw. lysiert werden. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraktion, wird zusammen
15 mit dem Kulturüberstand zur weiteren Reinigung der Aminosäure genommen. Es kann aber auch der Überstand alleine aufgearbeitet werden, wenn die Konzentration der Aminosäure ausreichend im Überstand enthalten ist. Die Aminosäure bzw. das Aminosäuregemisch kann dann weiter über beispielsweise eine Extraktion und/oder Salzfällung oder über eine Ionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt werden.
- 20 Falls erforderlich und gewünscht können weitere Chromatographieschritte mit einem geeigneten Harz folgen, wobei die Aminosäure entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht, oder wobei die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe mit dem Produkt (Aminosäure) hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere
25 Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und der wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes, zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

- 30 Im Fachgebiet sind viele Reinigungsverfahren bekannt, die nicht auf das vorhergehende Reinigungsverfahren eingeschränkt sind. Diese sind bspw. beschrieben in Bailey, J.E. & Ollis, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill: New York (1986).

- Die Identität und Reinheit der isolierten Aminosäure kann durch Standard-Techniken des Fachgebiets bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest
35 oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefasst in: Patek et al.

- (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60: 133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11: 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19: 67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

Beispiel 10: Klonierung der SEQ ID: No 1 für die Expression in Pflanzen

Soweit nichts anderes angegeben ist, werden Standardmethoden nach Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor 1989, Cold Spring Harbor

- 10 Laboratory Press, verwendet.

Die PCR-Amplifikation von SEQ ID: No1 erfolgte entsprechend dem Protokoll der *Pfu* Turbo DNA-Polymerase (Fa. Stratagene). Die Zusammensetzung war wie folgt: 1x PCR-Puffer [20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10mM (NH₄)SO₄, 0,1 % Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA], 0,2 mM d-Thio-dNTP und dNTP (1:125), 100 ng genomische DNA von *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm S288C; Fa. Research Genetics, Inc., jetzt Invitrogen), 50 pmol forward-Primer, 50 pmol reverse-Primer, 2,5 u *Pfu* Turbo DNA Polymerase. Die Amplifikationszyklen waren wie folgt:

1 Zyklus für 3' bei 95°C, gefolgt von 36 Zyklen jeweils mit 1' 95°C, 45'' 50°C, und 210'' 72 °C, gefolgt von 1 Zyklus für 8' bei 72 °C, dann 4 °C .

- 20 Folgende Primer-Sequenzen wurden gewählt für das Gen SEQ ID: NO 1:

i) forward-Primer (SEQ ID NO:1)

5'-GGAATTCCAGCTGACCACCATGACTGAATTCGAATTGCCTCCAA

ii) reverse-Primer (SEQ ID NO:1)

5'-GATCCCCGGGAATTGCCATGTCAGTATTTGTAGGTTTTTATTTTCGC

25

Im Anschluß wurde das Amplifikat über QIAquick-Säulen nach Standardprotokoll (Fa. Qiagen) gereinigt.

- Die Restriktion der Vektor-DNA (30 ng) wurde mit *EcoRI* und *SmaI* nach dem Standard-Protokoll geschnitten, die *EcoRI*-Schnittstelle nach dem Standard-Protokoll aufgefüllt (Fa. MBI-Fermentas) und durch Zugabe von Hochsalzpuffer gestoppt. Die Reinigung der geschnittenen Vektorfragmente erfolgte über Nucleobond-Säulen nach Standardprotokoll (Machery-Nagel). Es

30

57

wurde ein binärer Vektor verwendet, der zwischen den T-DNA-Bordersequenzen eine Selektionskassette (Promotor, Selektionsmarker, Terminator) sowie eine Expressionskassette mit Promotor, Klonierungskassette und Terminatorsequenz, enthielt. Außer in der Klonierungskassette besitzt der binäre Vektor keine *EcoRI* und *SmaI*-Schnittstellen. Verwendbare einsetzbare binären Vektoren sind dem Fachmann bekannt und eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens, R., Mullineaux, P. und Klee H., [(2000) "A guide to *Agrobacterium* binary vectors", Trends in Plant Science, Vol 5 No.10, 446–451. Die Klonierung kann je nach verwendetem Vektor auch vorteilhaft über andere Restriktionsenzyme erfolgen. Entsprechende vorteilhafte Schnittstellen können dem ORF durch die Verwendung entsprechender Primer für die PCR-Amplifikation angefügt werden.

Es wurden ca. 30 ng präparierter Vektor und eine definierte Menge präpariertes Amplifikat gemischt und durch Zugabe von Ligase ligiert.

Die Transformation der ligierten Vektoren erfolgte im gleichen Reaktionsgefäß durch Zugabe von kompetenten *E. coli*-Zellen (Stamm DH5alpha) und Inkubation für 20' bei 1 °C, gefolgt von einem Hitzeschock für 90" bei 42 °C und Abkühlung auf 4 °C. Dann erfolgte die Zugabe von Vollmedium (SOC) und eine Inkubation für 45' bei 37 °C. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz auf einer Agarplatte mit Antibiotika (ausgewählt, je nach verwendeten binären Vektor) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die erfolgreiche Klonierung wurde durch eine Amplifikation mit Hilfe von Primern überprüft, die stromaufwärts und stromabwärts von der Restriktionsschnittstelle binden und somit die Amplifikation der Insertion ermöglichen. Die Amplifikation erfolgte entsprechend dem Protokoll der *Taq* DNA-Polymerase (Fa. Gibco-BRL). Die Zusammensetzung war wie folgt: 1x PCR-Puffer [20 mM Tris-HCL (pH 8,4), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,2 mM dNTP, 5 pmol forward-Primer, 5 pmol reverse-Primer, 0,625 u *Taq* DNA-Polymerase.

Die Amplifikationszyklen waren wie folgt: 1 Zyklus für 5' bei 94 °C, gefolgt von 35 Zyklen jeweils mit 15" 94 °C, 15" 66 °C und 5' 72 °C, gefolgt von 1 Zyklus für 10' bei 72 °C, dann 4 °C.

Es wurden mehrere Kolonien überprüft, wobei nur eine Kolonie weiterverwendet wurde, für die ein PCR-Produkt der erwarteten Größe detektiert wurde.

Ein Aliquot dieser positiven Kolonie wurde in ein mit Vollmedium (LB) befülltes Reaktionsgefäß transferiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das LB-Medium enthielt für die Selektion des Klones ein Antibiotikum das je nach verwendeten binären Vektor und dem darin enthaltenen Resistenzgen ausgewählt wurde.

58

Die Plasmidpräparation erfolgte nach den Vorgaben des Qiaprep-Standardprotokolls (Fa. Qiagen).

Beispiel 11: Herstellung von transgenen Pflanzen, die SEQ ID: NO 1 exprimieren

1 ng der isolierten Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation in kompetente Zellen von
5 *Agrobacterium tumefaciens*, beispielsweise des Stamms GV 3101 pMP90 (Koncz and Schell, Mol. Gen. Gent. 204, 383-396, 1986) transformiert. Die Auswahl des Agrobakterienstamms, hängt von der Wahl des binären Vektors ab. Eine Übersicht über mögliche Stämme und ihre Eigenschaften findet sich in Hellens, R., Mullineaux, P. und Klee H. , [(2000) " A guide to *Agrobacterium* binary vectors , Trends in Plant Science, Vol 5 No.10, 446–451. Darauf erfolgte
10 die Zugabe von Vollmedium (YEP) und der Transfer in ein neues Reaktionsgefäß für 3 h bei 28 °C. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz auf YEP-Agarplatten mit den respektiven Antibiotika, bspw. Rifampicin und Gentamycin für GV3101 pMP90, sowie ein weiteres Antibiotika für die Selektion auf den binären Vektor ausplattiert und 48 h bei 28 °C inkubiert.

Die in den gemäß Beispiel 10 erzeugten Agrobakterien mit dem Plasmidkonstrukt wurden dann
15 für die Pflanzentransformation verwendet.

Es wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze eine Kolonie von der Agarplatte gepickt und in 3 ml TB Medium flüssig, das auch entsprechende Antibiotika, je nach Agrobakterienstamm und binären Plasmid enthält, aufgenommen. Die Vorkultur wuchs 48 h bei 28 °C und 120 rpm.

Zur Hauptkultur wurden 400 ml LB Medium, das die gleichen Antibiotika wie zuvor enthielt, verwendet. Die Vorkultur wurde in die Hauptkultur überführt. Diese wuchs 18 h bei 28 °C und
20 120 rpm. Nach dem Zentrifugieren bei 4000 rpm wurde das Pellet in Infiltrationsmedium (MS-Medium, 10 % Saccharose) resuspendiert.

Für die Anzucht der Pflanzen für die Transformation wurden Schalen (Piki Saat 80, grün mit Siebboden, 30 x 20 x 4,5 cm, Firma Wiesauplast, Kunststofftechnik, Deutschland) mit einem GS
25 90 Substrat (Einheitserde, Werkverband E.V., Deutschland) bis zur Hälfte gefüllt. Die Schalen wurden über Nacht mit 0,05 % Previcur Lösung (Previcur N, Aventis CropScience) gewässert. *Arabidopsis thaliana* C24 Samen (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, UK ; NASC Stock N906) wurden auf die Schale gestreut, etwa 1000 Samen je Schale. Die Schalen wurden mit einer Haube abgedeckt und in die Stratifizierung gestellt (8 h, 110 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}^{-1}$, 22 °C; 16 h,
30 dunkel, 6 °C). Nach 5 Tagen wurden die Schalen in das Kurztag-Phytotron gestellt (8h 130 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}^{-1}$, 22 °C; 16 h, dunkel 20 °C). Hier blieben sie etwa 10 Tage, bis die ersten Laubblätter gebildet wurden.

59

Die Keimlinge wurden in Töpfe, die das gleiche Substrat enthielten, transferiert (Teku-Töpfe, 10 cm, Serie LC, Hersteller Pöppelmann GmbH&Co, Deutschland). Es wurden neun Pflanzen in einen Topf pikiert. Die Töpfe wurden dann wieder zum weiteren Wachstum in das Kurztag-Phytotron gestellt.

- 5 Nach 10 Tagen kamen die Pflanzen dann in die Gewächshauskabine (Zusatzbeleuchtung, 16 h, 340 µE, 22 °C; 8 h, dunkel, 20 °C). Hier wuchsen sie noch 17 Tage weiter.

- 10 Für die Transformation wurden 6 Wochen alte, gerade blühende Arabidopsis-Pflanzen für 10 sec in die oben beschriebene Agrobakterien-Suspension getaucht. Dieses wurden zuvor mit 10 µl Silwett L77 (Crompton S.A., Osi Specialties, Schweiz) versetzt. Die entsprechende Methode ist beschrieben in Clough und Bent, 1998 (Clough, JC and Bent, AF. 1998 Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, Plant J., 16:735-743

- 15 Anschließend wurden die Pflanzen 18 h in eine feuchte Kammer gelegt. Danach stellte man die Töpfe zum weiteren Wachstum wieder ins Gewächshaus. Hier verblieben die Pflanzen noch 10 Wochen, bis die Samen geerntet werden konnten.

- 20 Je nach für die Selektion der transformierten Pflanzen verwendetem Resistenzmarker wurden die geernteten Samen im Gewächshaus ausgebracht und der Sprühselektion unterworfen oder aber nach Sterilisation auf Agarplatten mit dem respektiven Selektionsagens angezogen. Nach ca. 10–14 Tagen unterschieden sich die transformierten resistenten Pflanzen deutlich von den abgestorbenen Wildtypkeimlingen und konnten in 6-cm-Töpfe pikiert werden. Die Samen der transgenen *A. thaliana* Pflanzen wurden im Gefrierschrank (bei -20 °C) aufbewahrt.

Beispiel 12 Anzucht der Pflanzen für bioanalytische Untersuchungen.

- 25 Um die transgene Pflanzen bioanalytisch zu untersuchen wurde sie in einer speziellen Anzucht gleichmäßig kultiviert. Dazu wurde als Bodengemisch das GS-90 Substrat in der Topfmaschine (Laible System GmbH, Singen, Deutschland) gebracht und in die Töpfe gefüllt. Danach wurden 35 Töpfe in eine Schale zusammengestellt und mit Previcur behandelt. Für die Behandlung wurden 25 ml Previcur in 10 l Leitungswasser aufgenommen. Diese Menge reichte aus, um ca. 200 Töpfe zu behandeln. Die Töpfe wurden in die Previcur-Lösung gestellt und von oben zusätzlich mit Leitungswasser ohne Previcur begossen. Die Aussaat fand am gleichen Tag statt.
- 30

Für die Aussaat wurden die im Kühlschrank (bei -20 °C) aufbewahrten Samen aus den Eppendorfröhrchen mit Hilfe eines Zahnstochers entnommen und in die Töpfe mit der Erde überführt. Insgesamt wurden ca. 5–12 Samen in dem Topf mittig verteilt.

60

Nach der Aussaat wurden die Schalen mit den Töpfen mit einer dazu passenden Plastikhaube bedeckt und in die Stratifizierungskammer für 4 Tage bei einer Dunkelheit und 4 °C gestellt. Die Feuchtigkeit betrug ca. 80–90 %. Nach der Stratifizierung wurden die Testpflanzen 22–23 Tage bei einem 16 h Licht und 8 h Dunkelrhythmus bei 20 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 60 % und einer CO₂-Konzentration von 400 ppm kultiviert. Als Lichtquelle dienten Powerstar HQI-T 250 W/D Daylight Lampen von Osram, die ein dem Sonnenfarbspektrum ähnelndes Licht mit einer Lichtintensität von 220 µE/m²/s⁻¹ erzeugen.

Im Alter von 8, 9 und 10 Tagen wurden die Pflanzen der Selektion auf den Resistenzmarker unterworfen. Nach weiteren 3–4 Tagen konnten dann deutlich die transgenen, resistenten Keimlinge (Pflänzchen im Vierblattstadium) von den nicht transformierten Pflänzchen unterschieden werden. Die nicht transgenen Keimlinge waren ausgebleicht oder abgestorben. Die transgenen resistenten Pflanzen wurden im Alter von 14 Tagen vereinzelt. Die am optimalsten in der Mitte des Topfes gewachsenen Pflanzen wurden als Zielpflanze betrachtet. Mit Hilfe von Metallpinzetten wurden alle übrigen Pflanzen vorsichtig entfernt und verworfen.

Während des Wachstums wurden die Pflanzen mit destilliertem Wasser von oben (auf die Erde) und von unten in die Aufstellrinnen gegossen. Im Alter von 23 Tagen wurden dann die gewachsenen Pflanzen geerntet.

Beispiel 13: Metabolische Analyse von transformierten Pflanzen

Die erfindungsgemäß identifizierten Änderungen in dem Inhalt an beschriebenen Metaboliten wurden durch folgendes Verfahren identifiziert.

a) Probennahme und Lagerung der Proben

Die Probenahme fand direkt in der Phytotronkammer statt. Die Pflanzen wurden mit einer kleinen Laborschere abgeschnitten, rasch auf einer Laborwaage gewogen, in eine vorgekühlte Extraktionshülse überführt und in ein Aluminiumrack das durch Flüssigstickstoff gekühlt ist, gesteckt. Wenn erforderlich, können die Extraktionshülsen bei –80 °C im Gefrierschrank gelagert werden. Die Zeit vom Abschneiden der Pflanze bis zum Einfrieren in Flüssigstickstoff betrug nicht mehr als 10 – 20 s.

b) Gefriertrocknung

Es wurde darauf geachtet, dass während des Versuches die Pflanzen bis zum ersten Kontakt mit Lösemitteln entweder in tiefkaltem Zustand blieben (Temperaturen < –40 °C) oder durch Gefriertrocknen vom Wasser befreit wurden.

61

- Das Aluminiumrack mit den Pflanzenproben in den Extraktionshülsen wurde in die vorgekühlte (−40 °C) Gefriertrocknungsanlage gestellt. Die Anfangstemperatur während der Haupttrocknung betrug −35 °C, der Druck betrug 0,120 mbar. Während der Trocknung wurden die Parameter entsprechend eines Druck- und Temperaturprogrammes verändert. Die Endtemperatur nach 12 Stunden betrug +30 °C, und der Enddruck lag bei 0,001 bis 0,004 mbar. Nach dem Abschalten der Vakuumpumpe und der Kältemaschine wurde das System mit Luft (durch ein Trockenrohr getrocknet) oder Argon belüftet.

c) Extraktion

- Die Extraktionshülsen mit dem gefriergetrockneten Pflanzenmaterial wurden unmittelbar nach der Belüftung des Gefriertrocknungsgerätes in die 5-mL-Extraktionskartuschen der ASE überführt.

Die 24 Probenpositionen eines ASE-Gerätes (Accelerated Solvent Extractor ASE 200 mit Solvent Controller und AutoASE-Software (Firma DIONEX)) wurden mit Pflanzenproben gefüllt.

- Die polaren Substanzen wurden mit ca. 10 mL Methanol/Wasser (80/20, v/v) bei $T = 70\text{ °C}$ und $p = 140\text{ bar}$, 5 min Aufheizphase, 1 min statische Extraktion, extrahiert. Die lipophileren Substanzen wurden mit ca. 10 mL Methanol/Dichlormethan (40/60, v/v) bei $T = 70\text{ °C}$ und $p = 140\text{ bar}$, 5 min Aufheizphase, 1 min statische Extraktion, extrahiert. Beide Lösemittelgemische wurden in dasselbe Probengläschen (Zentrifugengläser, 50 mL mit Schraubkappe und durchstechbarem Septum für die ASE (DIONEX)) extrahiert.

- Die Lösung wurde mit internen Standards versetzt: Ribitol, L-Glycin-2,2-d₂, L-Alanin-2,3,3,3-d₄ und α -Methylglucopyranosid und Nonadecansäure-Methylester, Undecansäure-Methylester, Tridecansäure-Methylester, Nonacosansäure-Methylester.

Der Gesamtextrakt wurde mit 8 mL Wasser versetzt. Der feste Rückstand der Pflanzenprobe und die Extraktionshülse wurden verworfen.

- Der Extrakt wurde geschüttelt und dann bei mindestens 1400 g für 5 bis 10 min zentrifugiert, um die Phasentrennung zu beschleunigen. 1 mL der überstehenden Methanol/Wasser-Phase ("polare Phase", farblos) wurde für die weitere GC-Analyse abgenommen, 1 mL wurde für die LC-Analyse entnommen. Der Rest der Methanol/Wasser-Phase wurde verworfen. 0,5 mL der organischen Phase ("Lipide Phase", dunkelgrün) wurde für die weitere GC-Analyse entnommen, 0,5 mL wurden für die LC-Analyse entnommen. Alle entnommenen Aliquote wurden mit dem IR-Dancer Infrarot-Vakuum-Evaporator (Hettich) zur Trockne eingedampft. Die maximale Temperatur während des Eindampf-Vorgangs überschritt dabei nicht 40 °C. Der Druck im Gerät betrug nicht weniger als 10 mbar.

d) Weiterverarbeitung der Lipid-Phase für die LC/MS- oder LC/MS/MS-Analyse

Der zur Trocknung eingedampfte Lipide Extrakt wurde in Laufmittel aufgenommen. Der HPLC-Lauf wurde mit Gradientenelution durchgeführt.

Der zur Trocknung eingedampfte polare Extrakt wurde in Laufmittel aufgenommen. Der HPLC-Lauf wurde mit einer Gradientenelution durchgeführt.

e) Derivatisierung der Lipid-Phase für die GC/MS-Analyse

Zur Transmethanolyse wurde eine Mischung aus 140 µL Chloroform, 37 µL Salzsäure (37 Gew.-% HCl in Wasser), 320 µL Methanol und 20 µL Toluol zu dem eingedampften Extrakt zugefügt. Das Gefäß wurde dicht verschlossen und unter Schütteln 2 h bei 100 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde vollständig getrocknet.

Die Methoximierung der Carbonylgruppen erfolgte durch Reaktion mit Methoxyamin-Hydrochlorid (5 mg/mL in Pyridin, 100 µL für 1,5 h bei 60 °C im dicht verschlossenen Gefäß. 20 µL einer Lösung von ungeradzahligen, geradkettigen Fettsäuren wurden als Zeitstandards zugesetzt. Schließlich wurde mit 100 µL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoracetamid (MSTFA) für 30 min bei 60 °C im wieder dicht verschlossenen Gefäß derivatisiert. Das Endvolumen vor der GC-Injektion war 220 µL.

f) Derivatisierung der polaren Phase für die GC/MS-Analyse

Die Methoximierung der Carbonylgruppen erfolgte durch Reaktion mit Methoxyamin-Hydrochlorid (5 mg/mL in Pyridin, 50 µL für 1,5 h bei 60 °C im dicht verschlossenen Gefäß. 10 µL einer Lösung von ungeradzahligen, geradkettigen Fettsäuren wurden als Zeitstandards zugesetzt. Schließlich wurde mit 50 µL N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-2,2,2-trifluoracetamid (MSTFA) für 30 min bei 60 °C im wieder dicht verschlossenen Gefäß derivatisiert. Das Endvolumen vor der GC-Injektion war 110 µL.

g) Analyse der verschiedenen Pflanzenproben

Die Proben wurden in einzelnen Serien zu jeweils 20 Pflanzenproben (sogenannte Sequenzen) gemessen, wobei jede Sequenz mindestens 5 Wildtyppflanzen als Kontrolle enthält. Die Peakfläche oder die Peakhöhe jedes Analyten wurde durch die Peakfläche des jeweiligen Internen Standards dividiert. Die Daten wurden auf das für die Pflanze eingewogene Frischgewicht normiert. Die so berechneten Werte wurden auf die Wildtypkontrollgruppe bezogen, indem sie durch den Mittelwert der entsprechenden Daten der Wildtypkontrollgruppe derselben Sequenz dividiert wurden. Die erhaltenen Werte wurden als xfache bezeichnet, sind sequenzübergreifend

63

vergleichbar und geben an, wie vielfach sich die Analytkonzentration in der Mutante relativ zur Wildtypkontrolle unterscheidet.

Alternative können die Aminosäuren vorteilhaft über eine HPLC-Auftrennung in ethanolischen Extrakten nach Geigenberger et al. (Plant Cell & Environ, 19, 1996: 43 – 55) nachgewiesen werden.

5

Die Ergebnisse der verschiedenen Analysen der Pflanzen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Analyt-Nr	Analyt	Ratio_by_WT	Ratio_by_median	GC/LC
10000032	Methionin	3,46-3,58	3,31-3,4	LC
10000034	Threonin	0,45-0,15	0,61-0,15	LC
10000006	Threonin	0,17-0,16	0,18-0,16	GC
10000008	Methionin	3,31-3,67	3,5-3,53	GC

10

15

Spalte 1 der Tabelle gibt die Probennummer wieder. Spalte 2 ist die analysierte Aminosäure zu entnehmen. Spalte 3 zeigt das Verhältnis der analysierten Aminosäure zwischen der transgenen Pflanze und dem Wildtyp. Spalte 4 gibt das Verhältnis der transgenen Pflanze gegenüber dem Median anderer transgener Pflanzen, die nicht mit dem Threonin-Aldolase-Gen transformiert wurden, wieder. Spalte 5 gibt die Analysenmethode wieder.

Alle Ergebnisse ergaben sich bei unabhängiger Wiederholung der Analysen als signifikant.

20

Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren in transgenen Organismen dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- 5 a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Threonin-abbauendes Protein codiert, oder
- b) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz, die den Threoninabbau in den transgenen Organismen erhöht und
- 10 c) Expression einer unter (a) oder (b) genannten Nukleinsäuresequenz im transgenen Organismus.

Vorteilhaft wird in Verfahrensschritt (a) eine Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe

- 15 i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz;
- ii) einer Nukleinsäuresequenz, die aufgrund des degenerierten genetischen Codes durch Rückübersetzung der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz erhalten wird und
- iii) eines Derivats der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz codiert und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist; eingebracht.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Metanomics GmbH & Co. KGaA

<120> Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren

<130> 2002_960

<140> PF54195

<141> 2002-12-20

<160> 10

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1164

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1164)

<223> Threonin-Aldolase

<400> 1

atg	act	gaa	ttc	gaa	ttg	cct	cca	aaa	tat	atc	acc	gct	gct	aac	gac	48
Met	Thr	Glu	Phe	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys	Tyr	Ile	Thr	Ala	Ala	Asn	Asp	
1				5					10					15		

ttg	cgg	tca	gac	aca	ttc	acc	act	cca	act	gca	gag	atg	atg	gag	gcc	96
Leu	Arg	Ser	Asp	Thr	Phe	Thr	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Met	Met	Glu	Ala	
			20					25						30		

gct	tta	gag	gcc	tct	atc	ggt	gac	gct	gtc	tac	ggt	gaa	gat	gtt	gac	144
Ala	Leu	Glu	Ala	Ser	Ile	Gly	Asp	Ala	Val	Tyr	Gly	Glu	Asp	Val	Asp	
		35				40					45					

acc	gtt	agg	ctc	gaa	cag	acc	gtt	gcc	cgc	atg	gct	ggc	aaa	gaa	gca	192
Thr	Val	Arg	Leu	Glu	Gln	Thr	Val	Ala	Arg	Met	Ala	Gly	Lys	Glu	Ala	
	50					55					60					

t	ttg	ttc	tgt	gtc	tct	ggg	act	ttg	tcc	aac	cag	att	gcc	atc	aga	240
Gly	Leu	Phe	Cys	Val	Ser	Gly	Thr	Leu	Ser	Asn	Gln	Ile	Ala	Ile	Arg	
65					70				75					80		

act	cac	ttg	atg	caa	cct	cca	tac	tct	att	cta	tgt	gat	tac	agg	gct	288
Thr	His	Leu	Met	Gln	Pro	Pro	Tyr	Ser	Ile	Leu	Cys	Asp	Tyr	Arg	Ala	
			85					90						95		

cac	gtt	tac	act	cac	gaa	gcc	gct	gga	ctg	gcg	atc	ttg	tct	caa	gcg	336
His	Val	Tyr	Thr	His	Glu	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Ile	Leu	Ser	Gln	Ala	
			100					105						110		

atg	gtg	gtt	cct	gtg	gtt	cct	tcc	aac	ggt	gac	tac	ttg	acc	ttg	gaa	384
Met	Val	Val	Pro	Val	Val	Pro	Ser	Asn	Gly	Asp	Tyr	Leu	Thr	Leu	Glu	
		115				120								125		

gac	atc	aag	tca	cac	tac	gtc	cca	gac	gac	ggt	gat	att	cac	ggt	gcc	432
Asp	Ile	Lys	Ser	His	Tyr	Val	Pro	Asp	Asp	Gly	Asp	Ile	His	Gly	Ala	
	130					135					140					

ccc	acc	aga	ttg	att	tct	ctg	gaa	aac	act	tta	cac	ggt	att	gtt	tat	480
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Pro Thr Arg Leu Ile Ser Leu Glu Asn Thr Leu His Gly Ile Val Tyr 145 150 155 160	
cca ttg gaa gaa ctg gtc cgc atc aaa gct tgg tgt atg gaa aat ggt Pro Leu Glu Glu Leu Val Arg Ile Lys Ala Trp Cys Met Glu Asn Gly 165 170 175	528
ctc aaa cta cat tgt gac ggt gcc aga atc tgg aat gcc gct gca caa Leu Lys Leu His Cys Asp Gly Ala Arg Ile Trp Asn Ala Ala Ala Gln 180 185 190	576
tct ggc gtg cca tta aag caa tat ggg gaa atc ttc gac tcc atc tcc Ser Gly Val Pro Leu Lys Gln Tyr Gly Glu Ile Phe Asp Ser Ile Ser 195 200 205	624
atc tgt cta tcc aag tct atg ggt gct cct att ggg tcc gtc ttg gtt Ile Cys Leu Ser Lys Ser Met Gly Ala Pro Ile Gly Ser Val Leu Val 210 215 220	672
ggg aac ctt aag ttt gtc aag aag gcc acc cat ttc aga aaa caa caa Gly Asn Leu Lys Phe Val Lys Lys Ala Thr His Phe Arg Lys Gln Gln 230 235 240	720
ggg ggt ggt att aga caa tct ggt atg atg gct aga atg gct ctt gta Gly Gly Gly Ile Arg Gln Ser Gly Met Met Ala Arg Met Ala Leu Val 245 250 255	768
aac atc aac aac gat tgg aag tcc caa ttg ctg tac tcg cac tct ttg Asn Ile Asn Asn Asp Trp Lys Ser Gln Leu Leu Tyr Ser His Ser Leu 260 265 270	816
gct cat gaa tta gcc gaa tat tgt gag gca aag ggc atc ccg cta gag Ala His Glu Leu Ala Glu Tyr Cys Glu Ala Lys Gly Ile Pro Leu Glu 275 280 285	864
tct cca gca gac acc aac ttt gtc ttt att aac ctg aag gcc gct aga Ser Pro Ala Asp Thr Asn Phe Val Phe Ile Asn Leu Lys Ala Ala Arg 290 295 300	912
atg gac cca gat gtc ctt gtt aag aag ggt ttg aag tac aac gtt aag Met Asp Pro Asp Val Leu Val Lys Lys Gly Leu Lys Tyr Asn Val Lys 305 310 315 320	960
cta atg ggt ggt aga gtc tcg ttc cac tat caa gtc acc aga gat act Leu Met Gly Gly Arg Val Ser Phe His Tyr Gln Val Thr Arg Asp Thr 325 330 335	1008
ttg gaa aaa gtc aaa ttg gcc atc tcc gag gcc ttc gac tat gct aaa Leu Glu Lys Val Lys Leu Ala Ile Ser Glu Ala Phe Asp Tyr Ala Lys 340 345 350	1056
gaa cat cct ttc gac tgt aac gga cct acc cag att tac cgt agt gaa Glu His Pro Phe Asp Cys Asn Gly Pro Thr Gln Ile Tyr Arg Ser Glu 355 360 365	1104
tcc acc gag gtc gac gtt gat ggc aac gct atc cgc gaa ata aaa acc Ser Thr Glu Val Asp Val Asp Gly Asn Ala Ile Arg Glu Ile Lys Thr 370 375 380	1152
tac aaa tac tga Tyr Lys Tyr 385	1164

<210> 2

<211> 387

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 2

Met Thr Glu Phe Glu Leu Pro Pro Lys Tyr Ile Thr Ala Ala Asn Asp
1 5 10 15

Leu Arg Ser Asp Thr Phe Thr Thr Pro Thr Ala Glu Met Met Glu Ala
20 25 30

Ala Leu Glu Ala Ser Ile Gly Asp Ala Val Tyr Gly Glu Asp Val Asp
35 40 45

Thr Val Arg Leu Glu Gln Thr Val Ala Arg Met Ala Gly Lys Glu Ala
50 55 60

Gly Leu Phe Cys Val Ser Gly Thr Leu Ser Asn Gln Ile Ala Ile Arg
65 70 75 80

His Leu Met Gln Pro Pro Tyr Ser Ile Leu Cys Asp Tyr Arg Ala
85 90 95

His Val Tyr Thr His Glu Ala Ala Gly Leu Ala Ile Leu Ser Gln Ala
100 105 110

Met Val Val Pro Val Val Pro Ser Asn Gly Asp Tyr Leu Thr Leu Glu
115 120 125

Asp Ile Lys Ser His Tyr Val Pro Asp Asp Gly Asp Ile His Gly Ala
130 135 140

Pro Thr Arg Leu Ile Ser Leu Glu Asn Thr Leu His Gly Ile Val Tyr
145 150 155 160

Pro Leu Glu Glu Leu Val Arg Ile Lys Ala Trp Cys Met Glu Asn Gly
165 170 175

Leu Lys Leu His Cys Asp Gly Ala Arg Ile Trp Asn Ala Ala Ala Gln
180 185 190

Ser Gly Val Pro Leu Lys Gln Tyr Gly Glu Ile Phe Asp Ser Ile Ser
195 200 205

Ile Cys Leu Ser Lys Ser Met Gly Ala Pro Ile Gly Ser Val Leu Val
210 215 220

Gly Asn Leu Lys Phe Val Lys Lys Ala Thr His Phe Arg Lys Gln Gln
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ile Arg Gln Ser Gly Met Met Ala Arg Met Ala Leu Val
245 250 255

Asn Ile Asn Asn Asp Trp Lys Ser Gln Leu Leu Tyr Ser His Ser Leu
260 265 270

Ala His Glu Leu Ala Glu Tyr Cys Glu Ala Lys Gly Ile Pro Leu Glu
275 280 285

Ser Pro Ala Asp Thr Asn Phe Val Phe Ile Asn Leu Lys Ala Ala Arg
290 295 300

Met Asp Pro Asp Val Leu Val Lys Lys Gly Leu Lys Tyr Asn Val Lys
305 310 315 320

Leu Met Gly Gly Arg Val Ser Phe His Tyr Gln Val Thr Arg Asp Thr
325 330 335

Leu Glu Lys Val Lys Leu Ala Ile Ser Glu Ala Phe Asp Tyr Ala Lys
340 345 350

Glu His Pro Phe Asp Cys Asn Gly Pro Thr Gln Ile Tyr Arg Ser Glu
355 360 365

Ser Thr Glu Val Asp Val Asp Gly Asn Ala Ile Arg Glu Ile Lys Thr
370 375 380

Tyr Lys Tyr
385

<210> 3
1> 376
2> PRT
13> Soya

<400> 3
Gly Cys Phe Ala Cys Tyr Leu Val Gly Gly Phe Ser Val Gln Glu Lys
1 5 10 15

Met Val Thr Arg Ile Val Asp Leu Arg Ser Asp Thr Val Thr Lys Pro
20 25 30

Thr Glu Ala Met Arg Ala Ala Met Ala Ser Ala Glu Val Asp Asp Asp
35 40 45

Val Leu Gly Tyr Asp Pro Thr Ala Phe Arg Leu Glu Thr Glu Met Ala
50 55 60

Lys Thr Met Gly Lys Glu Ala Ala Leu Phe Val Pro Ser Gly Thr Met
65 70 75 80

Asn Leu Val Ser Val Leu Val His Cys Asp Val Arg Gly Ser Glu
85 90 95

Val Ile Leu Gly Asp Asn Cys His Ile Asn Ile Phe Glu Asn Gly Gly
100 105 110

Ile Ala Thr Ile Gly Gly Val His Pro Arg Gln Val Lys Asn Asn Asp
115 120 125

Asp Gly Thr Met Asp Ile Asp Leu Ile Glu Ala Ala Ile Arg Asp Pro
130 135 140

Met Gly Glu Leu Phe Tyr Pro Thr Thr Lys Leu Ile Cys Leu Glu Asn
145 150 155 160

Thr His Ala Asn Ser Gly Gly Arg Cys Leu Ser Val Glu Tyr Thr Asp
165 170 175

Arg Val Gly Glu Leu Ala Lys Lys His Gly Leu Lys Leu His Ile Asp
180 185 190

Gly Ala Arg Ile Phe Asn Ala Ser Val Ala Leu Gly Val Pro Val Asp

195	200	205
Arg Leu Val Gln Ala Ala Asp 210	Ser Val Ser Val Cys Leu Ser Lys Gly 215	
Ile Gly Ala Pro Val Gly Ser Val Ile Val Gly Ser Lys Asn Phe Ile 225		235 240
Ala Lys Ala Arg Arg Leu Arg Lys Thr Leu Gly Gly Gly Met Arg Gln 245	250	255
Ile Gly Leu Leu Cys Ala Ala Ala Leu Val Ala Leu Gln Glu Asn Val 260	265	270
Gly Lys Leu Glu Ser Asp His Lys Lys Ala Arg Leu Leu Ala Asp Gly 275	280	285
Leu Asn Glu Val Lys Gly Leu Arg Val Asp Ala Cys Ser Val Glu Thr 290	295	300
Asn Met Val Phe Ile Asp Ile Glu Glu Gly Thr Lys Thr Arg Ala Glu 310	315	320
Lys Ile Cys Lys Tyr Met Glu Glu Arg Gly Ile Leu Val Met Gln Glu 325	330	335
Ser Ser Ser Arg Met Arg Val Val Leu His His Gln Ile Ser Ala Ser 340	345	350
Asp Val Gln Tyr Ala Leu Ser Cys Phe Gln Gln Ala Leu Ala Val Lys 355	360	365
Gly Val Gln Lys Glu Met Gly Asn 370	375	

<210> 4
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Soya

100> 4 1	Phe Gly Leu Leu Ala Ile Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Lys Met Val 5 10 15
Pro Arg Ile Val Asp Leu Arg Ser Asp Thr Val Thr Lys Pro Ser Glu 20 25 30	
Ala Met Arg Ala Ala Met Ala Ser Ala Glu Val Asp Asp Asp Val Leu 35 40 45	
Gly Arg Asp Pro Ser Cys Phe Arg Leu Glu Thr Glu Met Ala Lys Ile 50 55 60	
Leu Gly Lys Glu Gly Ala Leu Phe Val Pro Ser Gly Thr Met Ala Asn 65 70 75 80	
Leu Ile Ser Val Leu Val His Cys Asp Ile Arg Gly Ser Glu Val Ile 85 90 95	
Leu Gly Asp Asn Ser His Ile His Ile Tyr Glu Asn Gly Gly Ile Ala 100 105 110	

Thr Leu Gly
115

<210> 5
<211> 127
<212> PRT
<213> Soya

<400> 5

Lys Thr Leu Xaa Gly Gly Met Arg Gln Val Gly Ile Leu Cys Ala Ala
1 5 10 15

Ala Leu Val Ala Leu Gln Glu Asn Val Gly Lys Leu Gln Ser Asp His
20 25 30

Asn Lys Ala Lys Leu Leu Ala Asp Gly Leu Asn Glu Ile Lys Gly Leu
35 40 45

Arg Val Asp Ile Ser Ser Val Glu Thr Asn Ile Ile Tyr Val Glu Val
50 55 60

Glu Gly Ser Arg Ala Thr Ala Ala Lys Leu Cys Lys Asp Leu Glu
65 70 75 80

Asp Tyr Gly Ile Leu Leu Met Pro Met Gly Ser Ser Arg Leu Arg Ile
85 90 95

Val Phe His His Gln Ile Ser Ala Ser Asp Val Gln Tyr Ala Leu Ser
100 105 110

Cys Phe Gln Gln Ala Val Asn Gly Val Arg Asn Glu Asn Gly Asn
115 120 125

<210> 6
<211> 147
<212> PRT
<213> Rice

<400> 6

Y Arg Arg Phe Arg Ala Ile Arg Asp Pro Met Gly Glu Leu Phe Tyr
1 5 10 15

Pro Thr Thr Lys Leu Ile Cys Leu Glu Asn Thr His Ala Asn Ser Gly
20 25 30

Gly Arg Cys Leu Ser Val Glu Tyr Thr Asp Arg Val Gly Glu Leu Ala
35 40 45

Lys Lys His Gly Leu Lys Leu His Ile Asp Gly Ala Arg Ile Phe Asn
50 55 60

Ala Ser Val Ala Leu Gly Val Pro Val Asp Arg Leu Val Gln Ala Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Ser Val Cys Leu Ser Lys Gly Ile Gly Ala Pro Val Gly
85 90 95

Ser Val Ile Val Gly Ser Lys Asn Phe Ile Ala Lys Ala Arg Arg Leu
100 105 110

Arg Lys Thr Leu Gly Gly Gly Met Arg Gln Ile Gly Leu Leu Cys Ala

115

120

125

Ala Ala Leu Val Ala Leu Gln Glu Asn Val Gly Lys Leu Glu Ser Asp
130 135 140

His Lys Lys
145

<210> 7

<211> 169

<212> PRT

<213> Rice

<400> 7

Gly Ile Pro Gly Xaa Thr Phe Arg Gly Asp Val Ala Lys Ser His Gly
1 5 10 15

Leu Lys Leu His Ile Asp Gly Ala Arg Ile Phe Asn Ala Ser Val Ala
20 25 30

Gly Val Pro Val His Arg Leu Val Lys Ala Ala Asp Ser Val Ser
35 40 45

Val Cys Ile Ser Lys Gly Leu Gly Ala Pro Val Gly Ser Val Ile Val
50 55 60

Gly Ser Thr Ala Phe Ile Glu Lys Ala Lys Ile Leu Thr Lys Thr Leu
65 70 75 80

Gly Gly Gly Met Arg Gln Val Gly Ile Leu Cys Ala Ala Ala Tyr Val
85 90 95

Ala Val Arg Asp Thr Val Gly Lys Leu Ala Asp Asp His Arg Arg Ala
100 105 110

Lys Val Leu Ala Asp Gly Leu Lys Lys Ile Lys His Phe Arg Val Asp
115 120 125

Thr Thr Ser Val Glu Thr Asn Met Val Phe Phe Asp Ile Val Asp Ser
130 135 140

G Ile Ser Pro Asp Lys Leu Cys Gln Val Leu Glu Gln Arg Asn Val
145 150 155 160

Leu Ala Met Pro Ala Gly Ser Lys Arg
165

<210> 8

<211> 362

<212> PRT

<213> Canola

<400> 8

Ile Glu Ile Lys Met Val Met Arg Thr Val Asp Leu Arg Ser Asp Thr
1 5 10 15

Val Thr Arg Pro Thr Asp Ala Met Arg Glu Ala Met Gly Ser Ala Glu
20 25 30

Val Asp Asp Asp Val Leu Gly Tyr Asp Pro Thr Ala Arg Arg Leu Glu
35 40 45

Glu Glu Ile Ala Lys Met Met Gly Lys Glu Ala Ala Leu Phe Val Pro
 50 55 60
 Ser Gly Thr Met Gly Asn Leu Ile Cys Val Met Val His Cys Asp Val
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Glu Val Ile Leu Gly Asp Asn Cys His Ile His Val Tyr
 85 90 95
 Glu Asn Gly Gly Ile Ser Thr Ile Gly Gly Val His Pro Lys Thr Ile
 100 105 110
 Lys Asn Glu Glu Asp Gly Thr Met Asp Leu Gly Ala Ile Glu Ala Ala
 115 120 125
 Ile Arg Asp Pro Lys Gly Ser Thr Phe Tyr Pro Ser Thr Arg Leu Ile
 130 135 140
 Cys Leu Glu Asn Thr His Ala Asn Ser Gly Gly Arg Cys Leu Ser Ala
 145 150 155 160
 Tyr Thr Asp Arg Val Gly Glu Ile Ala Lys Arg His Gly Leu Lys
 165 170 175
 Leu His Ile Asp Gly Ala Arg Leu Phe Asn Ala Ser Ile Ala Leu Gly
 180 185 190
 Val Pro Val His Arg Leu Val Gln Ala Ala Asp Ser Val Ser Val Cys
 195 200 205
 Leu Ser Lys Gly Leu Gly Ala Pro Ile Gly Ser Val Val Val Gly Ser
 210 215 220
 Gln Ser Phe Ile Glu Lys Ala Lys Thr Leu Arg Lys Thr Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Met Arg Gln Ile Gly Val Leu Cys Ala Ala Ala Leu Val Ala Leu
 245 250 255
 Gln Glu Asn Leu Pro Lys Leu Gln Phe Asp His Lys Lys Thr Lys Leu
 260 265 270
 Leu Ala Glu Gly Leu Asn Gln Met Lys Gly Ile Arg Val Asn Val Ala
 275 280 285
 Ala Met Glu Thr Asn Met Ile Phe Met Asp Met Glu Asp Gly Ser Lys
 290 295 300
 Leu Thr Ala Glu Lys Leu Arg Lys Ser Leu Thr Glu His Gly Ile Leu
 305 310 315 320
 Val Ile Pro Glu Asn Ser Thr Arg Ile Arg Met Val Leu His His Gln
 325 330 335
 Ile Thr Thr Ser Asp Val His Tyr Thr Leu Ser Cys Leu Gln Gln Ala
 340 345 350
 Val Gln Thr Ile His Glu Pro Cys Gln Asn
 355 360

<211> 196
 <212> PRT
 <213> Canola

<400> 9

Gly Phe Leu Leu Lys His Lys Tyr Ile Tyr Tyr Cys Cys Tyr Leu Phe
 1 5 10 15

Glu Ser Lys Ser Asn Asn Phe Leu Phe Ser Val Ile Lys Met Val Thr
 20 25 30

Pro Val Ile Arg Thr Val Asp Leu Arg Ser Asp Thr Val Thr Lys Pro
 35 40 45

Thr Glu Ser Met Arg Ser Ala Met Ala Asn Ala Glu Val Asp Asp Asp
 50 55 60

Val Leu Gly Asn Asp Pro Thr Ala Val Leu Leu Glu Arg Glu Val Ala
 65 70 75 80

Glu Ile Ala Gly Lys Glu Ala Ala Met Phe Val Pro Ser Gly Thr Met
 85 90 95

Gly Asn Leu Ile Ser Val Leu Val His Cys Asp Glu Arg Gly Ser Glu
 100 105 110

Val Ile Leu Gly Asp Asp Ser His Ile His Ile Tyr Glu Asn Gly Gly
 115 120 125

Val Ser Ser Leu Gly Gly Val His Pro Arg Thr Val Lys Asn Glu Glu
 130 135 140

Asp Gly Thr Met Glu Ile Ser Ser Ile Glu Ala Ala Val Arg Ser Pro
 145 150 155 160

Thr Gly Asp Leu His Tyr Pro Val Thr Lys Leu Ile Cys Leu Glu Asn
 165 170 175

Thr Gln Ala Asn Cys Gly Gly Arg Cys Leu Pro Ile Glu Tyr Ile Asp
 180 185 190

s Val Gly Glu
 195

<210> 10
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Canola

<400> 10

Ile Gly Ile Lys Met Val Met Arg Ile Val Asp Leu Arg Ser Asp Thr
 1 5 10 15

Val Thr Arg Pro Thr Asp Ala Met Arg Glu Ala Met Ala Ser Ala Glu
 20 25 30

Val Asp Asp Asp Val Leu Gly Tyr Asp Pro Thr Ala Arg Gly Leu Glu
 35 40 45

Glu Glu Met Ala Lys Met Met Gly Lys Glu Ala Ala Leu Phe Val Pro
 50 55 60

Ser Gly Thr Met Gly Asn Leu Ile Cys Val Met Val His Cys Asp Val

65

70

75

80

Arg Gly Ser Glu Val Ile Leu Gly Asp Thr Cys His Ile His Val Tyr
85 90 95

Glu Asn Gly Gly Ile Ser Thr Ile
100

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**